

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

COLLOQUE ANNUEL
DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

« La notion d'espèce bactérienne
à la lumière des découvertes récentes »

L'ESPÈCE BACTÉRIENNE

par André LWOFF.

*(Service de Physiologie microbienne,
Institut Pasteur, Paris)*

Pour certains peuples primitifs, le nom qui désigne un être possède une valeur magique. Avoir connaissance du nom d'un être c'est pénétrer sa nature intime. Parfois même le nom, en tant qu'il exprime et définit un être donné à l'exclusion de tous les autres, est considéré comme un élément particulier, se combinant au corps pour constituer l'être total. C'est le nâma-rûpa des Bouddhistes.

Pour certains bactériologistes, le nom d'une bactérie semble lui aussi doué d'une vertu miraculeuse. A voir en effet la facilité avec laquelle sont souvent créées des espèces nouvelles, il est

évident que pour beaucoup, par la grâce de la nomenclature binaire, le problème de l'espèce se trouve résolu avant même que d'être posé.

Le droit de légiférer en matière de nomenclature appartient, vous le savez, à la Commission judiciaire du Comité international de Nomenclature bactériologique de l'Association internationale des Sociétés nationales de Microbiologie. Et c'est probablement en souvenir de nos souffrances communes lors des sessions de cette Commission que M. Prévôt m'a demandé d'ouvrir cette séance.

Je ne me sens ni plus ni moins qualifié pour remplir cette tâche que n'importe lequel d'entre vous. Sans doute ai-je, depuis 1921, baptisé quelques espèces, genres, familles et ordres de Protozoaires. Sans doute pourrais-je dire aussi comme tel zoologiste : « on m'a fait l'honneur de donner mon nom à plusieurs animaux ». Cela n'est point une justification suffisante. N'importe quel scientifique doit cependant être capable de discuter de sujets sur lesquels il n'a pas de lumières particulières. Il lui suffit pour cela d'assimiler les idées des autres. C'est ce que j'ai tenté de faire. Ma tâche a été facilitée du fait que nombre d'excellents biologistes ont fort doctement parlé de l'espèce.



Mayr définit les espèces comme des groupes de populations naturelles se reproduisant sexuellement entre elles et isolées d'autres groupes similaires du point de vue de la reproduction.

Pour Cuénot, appartiennent à la même espèce des populations d'individus apparentés, plus ou moins semblables entre eux, ayant un stock commun de gènes et même genre de vie. Très généralement ils sont interféconds et leur progéniture est, elle aussi, féconde. Le fait que des organismes possèdent en commun un certain nombre de caractères n'est en somme qu'une conséquence de la communauté reproductive, et, en définitive, une expression de parenté.

Le besoin sexuel est en général impératif. Toutefois, il faut ajouter deux remarques : 1° pour que des organismes s'apparient il faut nécessairement qu'ils se rencontrent ; 2° des organismes n'ont de chance de se rencontrer que s'ils ne vivent pas trop loin les uns des autres. C'est pourquoi la notion d'espèce est inséparable de la notion de groupe, de population occupant une région déterminée. Un territoire est malheureusement difficile à délimiter car toute frontière est nécessairement fragile et souvent même gênante. Aussi, Simpson a-t-il proposé de considérer le concept « d'espèce sans dimensions ». Et L'Héritier définit l'espèce comme « la communauté des organismes qui se

reproduisent effectivement entre eux ou sont potentiellement capables de le faire ». « La communauté reproductive, écrit L'Héritier, est la seule réalité naturelle ». C'est une aimable conclusion.

Il se trouve que la sexualité bactérienne, si elle est caractérisée essentiellement par le contact de deux épidermes, n'est cependant jamais l'échange de deux chromosomes. Le mâle bactérien n'introduit le plus souvent dans la femelle qu'une fraction minime de son appareil génétique que la femelle reçoit sans rien donner en échange. La transformation aussi bien que la transduction ne comportent, elles aussi, qu'un transfert partiel. La conjugaison bactérienne et ses succédanés ne représentent donc que des processus sexuels incomplets qui sont loin de faire de l'espèce une communauté reproductive.

Quoi qu'il en soit, tous les biologistes admettent que la reproduction par croisement interne, *l'interbreeding*, est le test ultime de la conspécificité chez les animaux et les plantes supérieures. Le problème de l'espèce n'est pas pour autant résolu. En effet, beaucoup d'espèces appartenant au même genre, bien séparées par leur morphologie, leur écologie, leur habitat et de ce fait acceptées universellement comme espèces, sont capables de se croiser. Leurs génomes sont donc compatibles et ces espèces sont qualifiées de syngamiques. Une telle population, dont les membres peuvent se croiser ou échanger des gènes, est appelée syngameon, espèce collective, ou linnéon.

Il existe malheureusement tous les intermédiaires possibles entre espèces syngamiques, d'une part, et espèces interstériles, d'autre part, celle-ci considérées comme « véritablement bonnes espèces ». La reproduction sexuelle ne résout donc pas tous les problèmes relatifs à l'espèce.

★ ★

Si la sexualité est parfois responsable de graves problèmes, son absence pose des problèmes beaucoup plus redoutables encore. La notion d'espèce, difficile à saisir chez les organismes à reproduction sexuelle, s'évanouit en effet lorsqu'on considère les organismes à reproduction asexuelle.

Nous sommes réunis pour porter secours à l'espèce asexuelle, pour tenter de circonscrire la notion d'espèce asexuelle. Une espèce asexuelle a été définie comme une population renfermant un ou plusieurs biotypes et qui, bien entendu, se reproduit asexuellement. On appelle biotype un groupe d'individus possédant essentiellement le même patrimoine héréditaire et ayant donc nécessairement en commun la grande majorité de leurs caractères.

Les espèces des bactériologistes sont en règle générale asexuelles. Prenons pour point de départ un individu bactérien donné. Nous pouvons admettre que tous ses descendants et leurs mutants appartiennent à la même espèce. Les mutations peuvent cependant porter sur des gènes gouvernant des caractères très divers : utilisation de l'aliment énergétique, synthèse des métabolites essentiels, synthèse de substances antigéniques, etc. Par le jeu des mutations et de la sélection, les descendants de notre bactérie originelle pourront différer de l'ancêtre par un grand nombre de caractères. Notre espèce est un stade d'un processus évolutif, un état d'équilibre précaire, une tranche d'évolution. A partir de quel nombre de mutations le descendant sera-t-il promu au rang d'espèce autonome ? Il est évident que le choix ou le groupement des caractères qui définiront l'espèce ou le groupe dépendra de l'idiosyncrasie de chacun.

Que devient, que représente pour les espèces asexuelles la notion de dimension ? L'idée de territoire, de région où les organismes peuvent se rencontrer et se joindre n'a évidemment plus de sens. Cependant il est nécessaire d'ajouter aux caractères propres des individus une donnée qui précisera le contour de l'espèce asexuelle. La notion même d'espèce implique d'ailleurs la mise en jeu d'une composante qui transcende l'individu. Cette composante sera, non pas le territoire en tant qu'il assure une probabilité de rencontre copulatoire, mais le milieu, le milieu dont le pouvoir sélecteur domine et gouverne l'évolution et l'équilibre dynamique de l'espèce asexuelle.

L'espèce n'a donc pas d'existence réelle. L'espèce est l'idée nécessairement arbitraire que nous nous faisons d'une catégorie d'organismes. L'espèce est un concept. Le monde bactérien asexué, où chaque organisme n'aspire qu'à affirmer sa personnalité est l'expression d'un désordre extrême. Il convient d'opposer à cette anarchie en expansion un arbitraire des plus rigoureux. L'appareil de la nomenclature binaire a été forgé à cette fin. Les rebelles ont été soumis par la pensée et contraints de justifier un système intemporel. Malheureusement, les catégories étiquetées espèces ignorent nos lois et continuent à mener une existence aventureuse et individuelle, défi permanent aux bactériologistes en général et aux systématiciens en particulier.

Cependant, la nomenclature binaire est un instrument de travail indispensable, un facteur d'ordre, une langue internationale et le substrat de la systématique. Les bactéries doivent avoir des noms et des prénoms, des noms de genres et des noms d'espèces, faute de quoi nous ne saurions en discuter.

L'esprit dégagé de tout préjugé et de toute passion, nous voici préparés à entendre quelques rapports spécifiques. N'oublions

pas toutefois de méditer la phrase que l'auteur de *l'Imitation*, dans le chapitre : « De la doctrine de la Vérité », a écrite pour les bactériologistes : « Que nous importe ce qu'on dit sur les genres et sur les espèces ».

BIBLIOGRAPHIE

CUÉNOT (L.). *L'espèce*. G. Doin et C^o, édit., Paris, 1936.

L'HÉRITIER (Ph.). *Traité de génétique. II. La génétique des populations*. Presses Universitaires de France, Paris, 1954.

MAYR (E.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1953, **56**, 391-397.

LA NOTION D'ESPÈCE A TRAVERS QUELQUES DONNÉES BIOCHIMIQUES RÉCENTES ET LE CYCLE L

par R. VENDRELY.

(Centre de Recherches sur les Macromolécules, Strasbourg)

I. — LES ÊTRES SUPÉRIEURS.

Chez les êtres supérieurs, la notion d'espèce est presque intuitive et elle se base essentiellement sur les données morphologiques. Le biochimiste en ce domaine ne peut avoir qu'un rôle tout à fait secondaire, une place de parent pauvre. En effet, que pourrait-il apporter qui vaille la riche moisson des morphologistes, embryologistes et paléontologistes ? Ici des différences dans le métabolisme de l'azote, là une complexité accrue, ou au contraire une simplification dans telle chaîne enzymatique, ou la présence de tel pigment respiratoire. Ces données précieuses, bien qu'encore fragmentaires, révèlent certainement, et dans certains cas d'une façon frappante, une évolution biochimique sous-jacente à l'évolution morphologique. Les travaux biochimiques actuels (Baldwin [5], Florkin [31]) nous font entrevoir tout un vaste champs d'investigations à peine exploré ; mais si ces données montrent certaines différences ou similitudes biochimiques entre des embranchements, des classes des grands groupes d'animaux, elles sont peu utilisables au niveau des espèces.

1° LE CONTENU EN ADN DES NOYAUX. — Il est cependant un domaine où biochimie et génétique apparaissent à l'heure actuelle très étroitement liées, c'est celui de l'ADN qui représente certainement un constituant essentiel, sinon le seul constituant des gènes. L'étude biochimique de l'ADN devrait donc permettre de serrer de plus près le problème de la définition des espèces en recherchant au niveau même des molécules géniques des différences responsables des caractères distinctifs des espèces animales ou végétales. En effet, on sait maintenant que le contenu en ADN des noyaux de toutes les cellules d'un individu, quel que soit le

tissu ou l'organe considéré, représente une valeur constante caractéristique de l'espèce et cette valeur se comporte exactement comme le nombre des chromosomes, diploïde dans les cellules somatiques et haploïde dans les gamètes. C'est en 1948 que, sous la direction de notre regretté maître le professeur Boivin, nous avons pu mettre en évidence cette relation chez les Bovidés (41, 80) : en effet, les noyaux de thymus, de foie, de pancréas et de rein de veau contiennent $6,4 \times 10^{-9}$ mg d'ADN, alors que les spermatozoïdes de taureau ne contiennent que $3,2 \times 10^{-9}$ mg d'ADN, soit très exactement la moitié. Cette notion de la constance de la teneur en ADN des noyaux s'est montrée extrêmement féconde et s'est développée rapidement grâce aux progrès de la cytochimie quantitative en lumière visible.

En ce qui concerne le problème qui nous occupe en ce moment, la teneur des noyaux en ADN peut devenir un élément utile de taxonomie, au même titre que la formule chromosomique dont elle semble être le reflet biochimique. Nous avons réuni dans le tableau I un certain nombre de résultats concernant la teneur en ADN des noyaux chez quelques Vertébrés.

Il est évident que ces résultats comportent une certaine marge d'erreur, de l'ordre de 5 à 10 p. 100. Ils sont en effet établis par dosage d'ADN de noyaux ou de spermatozoïdes, et numération de ces éléments. Leur précision dépend donc de celle du dosage d'une part, et de celle de la numération d'autre part. Que peut-on conclure de ces premières données ? Tout d'abord en ce qui concerne les Mammifères, les 10 animaux déjà étudiés montrent une similitude assez frappante de leur teneur en ADN par noyau : tous les résultats se groupent entre 5 et $6,4 \times 10^{-9}$ mg. Nous ne saurions décider si les faibles différences constatées entre les teneurs en ADN du cobaye et du chien ou du lapin et du cheval, par exemple, sont vraiment significatives et caractéristiques de l'espèce ou bien si elles sont dues à la marge d'erreur de la méthode de dosage utilisée. Une étude minutieuse serait ici nécessaire pour trancher la question.

Quoi qu'il en soit, si l'on passe aux Oiseaux, tous les résultats sont encore remarquablement groupés, mais leur valeur moyenne représente moins de la moitié de la valeur trouvée chez les Mammifères. Dans les autres groupes : Poissons, par exemple, des variations considérables peuvent être observées d'une espèce à l'autre ; ainsi, si le brochet a dans ses noyaux $1,7 \times 10^{-9}$ mg d'ADN, la carpe en a 3,2 et la truite 4,9. Cependant de nombreuses espèces ont des valeurs plus faibles, très voisines de celles du brochet (1,7 à 1,9). On peut imaginer ici, pour expliquer ces résultats, un processus de polyploïdie évoluant à partir d'un stock minimum d'ADN qui serait présent dans de nombreuses espèces d'un groupe zoologique avec des variations

TABLEAU I. — Teneur en ADN (10^{-9} mg par noyau)
des cellules somatiques de divers Vertébrés (*).

Esèces animales	DNA	DNA
<u>Dipneustes</u>	:	:
Pretepterus	100	:
<u>Poissons</u>	:	:
Carpe (Cyprinus carpio)	3,49	3,2
Barbeau (Barbus barbus)	:	3,4
Gardon (Gardonus rutilus)	:	1,9
Tanche (Tinca tinca)	:	1,7
Perche (Perca fluviatilis)	:	1,9
Brochet (Esox lucius)	:	1,7
Truite (Salmo irideus)	:	4,9
Anguille (Anguilla anguilla)	:	1,9
Poisson chat (Ameiurus nebulosus)	1,89	1,8
<u>Amphibiens</u>	:	:
Amphiuma	168	:
Necturus	48,4	:
Grenouille	15	:
Crapaud	7,33	:
<u>Reptiles</u>	:	:
Tortue (Green turtle)	5,27	:
Tortue (Wood turtle)	4,92	:
Tortue (Snapping turtle)	4,97	:
Alligator	4,98	:
Serpent (Water snake)	5,02	:
Serpent (Pilot snake)	4,28	:
Serpent (Black racer snake)	2,85	:
<u>Oiseaux</u>	:	:
Poule	2,34	2,2
Pintade	2,27	:
Oie	2,92	1,9
Canard	2,65	2,2
Pigeon	:	2
Dinde	:	1,9
Faisan	:	1,7
Moineau	:	1,9
<u>Mammifères</u>	:	:
Boeuf	:	6,4
Porc	:	5,1
Cobaye	:	5,9
Chien	:	5,3
Homme	:	6
Lapin	:	5,3
Cheval	:	5,8
Mouton	:	5,7
Rat	:	5,7
Souris	:	5
:	:	:

(*) Nous ne rapportons ici que quelques résultats empruntés à C. et R. Vendrely [77] et à Mirsky [55] concernant les Vertébrés.

infinies d'une espèce à l'autre. Ce stock minimum serait doublé ou triplé dans certains cas. Ce processus de polyploïdie serait extrême chez les Amphibiens qui peuvent avoir jusqu'à 168×10^{-9} mg d'ADN dans les noyaux, soit à peu près cent fois la teneur minimum des Poissons ou des Oiseaux.

Le mot de polyploïdie peut paraître abusif lorsqu'il ne s'agit que de données biochimiques sans une étude du nombre des chromosomes. Cependant, l'élégante méthode de cytophotométrie quantitative rend possible la mesure de l'ADN d'un seul noyau choisi dans une coupe de tissus ou un frottis et a permis de montrer que les différentes classes de noyaux polyploïdes situés dans le foie, par exemple, ont respectivement pour contenu en ADN le double et le quadruple de la teneur diploïde [65]. D'autre part, dans les glandes salivaires de drosophile, dont les noyaux contiennent les énormes chromosomes géants, Swift et Rasch [72] ont trouvé des teneurs en ADN par noyau cinq cents fois plus élevées que celles des cellules diploïdes, ce qui correspond à un degré de polyploïdie de mille fois. Ici, le nombre de chromosomes n'a pas varié, mais c'est l'unité du chromosome lui-même, la chromatide, qui a doublé un nombre considérable de fois. Ce processus de polyténie est objectivé très exactement par la quantité totale d'ADN trouvée dans de tels noyaux. D'autre part, on a montré chez des espèces polyploïdes un dédoublement de l'ADN des noyaux par rapport à l'espèce normale.

Il apparaît donc que le contenu par noyau en ADN peut et doit intervenir, selon l'expression de Mrs Schrader, comme un instrument utile de cytotaxonomie. En effet, Matthey [50] l'a souligné, dans l'étude de la formule chromosomique entre espèces voisines, il faut envisager non seulement le nombre des chromosomes, mais encore la longueur totale qu'auraient ces chromosomes mis bout à bout, car un simple processus de fragmentation peut intervenir et accroître considérablement le nombre des chromosomes sans que soit accrue leur quantité de matière. Il est parfois difficile, sinon impossible, pour le cytologiste de décider si la différence entre le nombre des chromosomes entre deux ou plusieurs proches espèces résulte d'une fragmentation ou d'une duplication de ces éléments. C'est alors que la mesure du contenu en ADN du noyau permettra de se prononcer. Que cette teneur soit la même dans deux espèces voisines à formule chromosomique différente et l'on pourra dire que l'une dérive de l'autre par fragmentation des chromosomes; qu'elle soit doublée ainsi que le nombre de chromosomes dans l'une des espèces, il s'agit bien de polyploïdie. Mais si cette teneur est doublée alors que le nombre des chromosomes reste le même, il s'agit de polyténie.

Ce procédé d'investigation a été utilisé par Mrs Schrader [36]

chez les *Mantidae* où elle a pu montrer, grâce à la considération de la teneur en ADN par noyau, une possibilité de polyplœidisation dans un cas. Moses et Yerganian [57] chez les hamsters, Rendel et Kellermann [64] chez les kangourous, ont également utilisé avec succès la mesure d'ADN par noyau dans leurs problèmes de cytotaxonomie.

Ainsi cette constante ADN peut représenter un élément utile dans la détermination des espèces. Mais si l'on cherche à s'élever à un point de vue évolutif tout à fait général, peut-on dire que la teneur en ADN par noyau est susceptible de représenter un index de la complexité génétique des êtres vivants ? En d'autres termes, cette quantité s'élève-t-elle depuis les espèces inférieures comportant un nombre relativement petit de gènes jusqu'aux espèces supérieures avec l'immense complexité de leurs caractères héréditaires ? Mirsky et Ris [55] ont étudié le contenu en ADN des noyaux d'un grand nombre d'animaux, Vertébrés et Invertébrés. Ces résultats sont encore trop peu nombreux et ne peuvent permettre de conclusion définitive, l'intervention de phénomènes de polyploidie, sans aucun rapport avec la complexité des animaux, rendant difficile une interprétation valable. On ne peut donc dire que la teneur en ADN des noyaux s'élève selon le perfectionnement des êtres vivants. Cependant, si l'on considère les Invertébrés, il apparaît assez nettement que cette valeur est plus élevée chez les espèces les plus évoluées que chez les animaux primitifs.

Enfin, si l'on passe aux microorganismes, cette teneur peut être cent à mille fois inférieure à celle trouvée chez les Mammifères par exemple. Il est possible, il est même très vraisemblable, que l'ADN contenu dans le noyau représente plus que le matériel génique indispensable. Nous avons vu en effet que les noyaux polyploïdes contenaient deux fois, quatre fois et jusqu'à mille fois la quantité d'ADN nécessaire ; il peut donc y avoir un « luxe » d'ADN, ce qui évidemment compliquerait singulièrement le problème.

Ainsi, dans l'état actuel de nos connaissances, si l'étude quantitative de l'ADN par noyau peut apporter des indications utiles dans certains aspects de la taxonomie, son degré de précision insuffisant, la difficulté de son interprétation en limitent considérablement l'emploi.

2° STRUCTURE DE L'ADN. — D'ailleurs, ce qui compte lorsqu'on s'adresse à des espèces peu éloignées, ce n'est pas le nombre de gènes, mais la qualité de ces gènes. Si l'on admet en effet qu'en définitive les gènes sont représentés par des structures différentes au niveau des molécules d'ADN, c'est à la structure même de l'ADN qu'il faudra s'adresser pour essayer de découvrir des

particularités biochimiques caractérisant tel ou tel groupe d'animaux.

C'est à Chargaff [14] et à son équipe que nous devons la plupart des données déjà nombreuses que nous possédons à l'heure actuelle. Grâce à la technique de chromatographie, ces auteurs ont pu comparer les proportions de mononucléotides de chaque type entrant dans la composition de la molécule d'ADN. La technique chromatographique comporte, d'une part, la séparation sur papier des bases puriques et pyrimidiques libérées de l'ADN par hydrolyse et, d'autre part, l'estimation quantitative des bases ainsi séparées par l'emploi de la spectrophotométrie en ultraviolet.

Pour que l'évaluation des proportions relatives des bases puriques et pyrimidiques soit valable dans un échantillon d'ADN donné, il faut que cet échantillon n'ait subi aucune dégradation du fait du traitement appliqué au cours de l'extraction et de la purification. Il faut également éviter autant que possible l'action des nucléases cellulaires qui commencent à agir après la mort de la cellule. On peut en effet imaginer que tel agent chimique, tel enzyme cellulaire puisse attaquer de préférence un groupe donné de nucléotides modifiant de ce fait la répartition initiale des bases puriques et pyrimidiques. Il faut aussi s'assurer qu'aucune contamination de l'ADN par l'ARN n'est intervenue.

Il est difficile d'éliminer totalement toutes ces causes d'erreur, mais même en tenant compte des restrictions que comportent les limitations de la technique, les résultats obtenus présentent un intérêt considérable (tableau II).

Il apparaît, d'après ces résultats, que la structure simple tétra-nucléotidique de l'ADN comportant des quantités équimoléculaires de bases azotées, ne répond pas à la réalité. Les proportions entre adénine et guanine, thymine et cytosine, sont en effet rarement égales à l'unité. D'autre part, si l'on considère ces rapports dans différents organes d'un même animal, les rapports des bases sont approximativement les mêmes, mais, que l'on passe d'une espèce à l'autre, et ces rapports peuvent différer alors de façon marquée. Ainsi, Chargaff souligne que, même chez deux espèces relativement peu éloignées comme le bœuf et l'homme, des différences statistiquement significatives existent. Ainsi le rapport adénine/guanine, qui est en moyenne de 1,50 chez l'homme, n'est que de 1,30 chez le bœuf ; le rapport thymine/cytosine, qui avoisine 1,76 chez l'homme, n'est que de 1,36 chez le bœuf. Remarquons également que chez tous les animaux l'adénine et la thymine prédominent toujours sur la guanine et la cytosine. Il n'en est pas de même, comme nous le verrons plus loin, dans le monde des microorganismes. Enfin, dans tous les ADN obtenus

jusqu'à présent, le rapport purines totales/pyrimidines totales est toujours très proche de 1, de même que les rapports adénine/thymine et guanine/cytosine. Il semble donc qu'il y ait un équilibre nécessaire entre bases puriques et bases pyrimidiques

TABLEAU II. - Composition de préparations d'ADN de diverses origines.

	Rapports Moléculaires				
	Adénine Guanine	Thymine Cytosine	Adénine Thymine	Guanine Cytosine	Purines Pyrimidines
Homme (sperme)	1,60	1,70	0,92	0,07	0,94
(thymus)	1,47	1,75	1,00	1,19	1,07
(foie)	1,42	1,80	1,00	1,26	1,09
(foie carcinome)	1,50	1,80	1,00	1,30	1,07
Boeuf (sperme)	1,29	1,31	1,05	1,01	1,03 ⁽¹⁾
(thymus)	1,29	1,43	1,04	1,00	1,10
(thymus)	1,20	1,41	0,97	1,14	1,04
(thymus)	1,43	1,40	1,03	1,01	1,02
(thymus)	1,31	1,31	1,02	0,96 ⁽¹⁾	0,99 ⁽¹⁾
(rate)	1,25	1,40	1,07	1,30	1,10
(rate)	1,33	1,35	1,00	0,95 ⁽¹⁾	0,98 ⁽¹⁾
(rein-noyaux)	1,27	1,28	1,00	1,01	1,00
(rein entier)	1,25	1,35	1,00	1,08	1,03
(coeur-noyaux)	1,22	1,23	0,99	1,00	1,00
Mouton (rate)	1,26	1,36	0,98	1,05	1,01
Bouc (sperme)	1,31	1,30	1,05	1,00 ⁽¹⁾	1,03 ⁽¹⁾
Cheval (rate)	1,29	1,37	1,07	1,14	1,10
Rat (moelle osseuse)	1,34	1,39	1,01	1,00 ⁽¹⁾	1,00 ⁽¹⁾
Poule (érythrocyte)	1,40	1,36	0,99	0,96	0,97
(érythrocyte)	1,45	1,29	1,06	0,91	0,99
(blanc d'oeuf)	1,39	1,29	1,08	1,01	1,06
Tortue (érythrocyte)	1,31	1,31	1,03	1,03	1,03
Saumon (sperme)	1,43	1,43	1,02	1,02	1,02
Hareng (sperme)	1,25	1,32	1,01	0,98 ⁽¹⁾	1,00 ⁽¹⁾
Truite (sperme)	1,32	1,36	1,08	1,11	1,10
Alose (testicules)	1,30	1,43	0,97	1,07	1,01
<i>Locusta migratoria</i>	1,43	1,41	1,00	0,98 ⁽¹⁾	0,99 ⁽¹⁾
<i>Arbacia punctulata</i> (sperme)	1,46	1,70	0,87	1,01	0,97
<i>Arbacia punctulata</i> (sperme)	1,46	1,58	0,99	1,09	1,02
<i>Arbacia forbesii</i> (sperme)	1,45	1,47	1,10	1,11	1,10
<i>Arbacia livula</i> (sperme)	1,64	1,58	1,02	1,00	1,01
<i>Echinus esculentus</i> (sperme)	1,59	1,60	1,05	0,96 ⁽¹⁾	1,01 ⁽¹⁾
<i>Psammochinus militaris</i>	1,83	1,80	1,02	1,00	1,01
<i>Paracentrotus lividus</i>	1,85	1,85	1,02	1,02	1,02
<i>Echinocardium cordatum</i>	1,93	1,79	1,02	0,95	1,00

(1) Les nombres marqués d'un astérisque comprennent la 5-méthylcytosine ; quand cette pyridine est comptée, les rapports purines totales/pyrimidines totales sont très proches de l'unité.

(2) Ces valeurs concernent le rapport guanine/cytosine + 5-méthylcytosine. Ce rapport est plus proche de l'unité que le rapport guanine/cytosine.

et que la proportion quantitative d'une base purique comme l'adénine ou la guanine impose une proportion identique d'une autre base pyrimidique cette fois thymine ou cytosine. Cette constatation a été utilisée dans l'établissement du schéma struc-

tuel de l'ADN, où les bases sont accouplées par paires adénine-thymine, guanine-cytosine.

Ainsi, la structure de l'ADN semble obéir à un plan général valable pour tous les êtres vivants, mais l'étude du rapport des bases révèle des différences suivant les espèces. Il faut cependant remarquer que ces différences sont faibles et parfois peu significatives et ne rendent pas compte de la place qu'occupent les animaux en question dans l'échelle des êtres. Ainsi, l'homme et l'oursin semblent avoir le même ADN en ce qui concerne le rapport des bases. Il est vrai que ces rapports de bases ne représentent qu'une moyenne statistique de très nombreux arrangements répondant aux nombreux gènes. En effet, dans l'échantillon étudié existent probablement des centaines ou des milliers d'arrangements structuraux différents, dont l'analyse chromatographique ne donne qu'une idée globale en faisant apparaître les proportions dominantes.

3° LES NUCLÉOPROTÉINES. — On peut se demander si l'étude, non plus du seul ADN, mais aussi de la protéine avec laquelle il forme un complexe serait susceptible de faire apparaître d'autres éléments de différenciation entre les espèces. Depuis quelques années, nous avons nous-mêmes entrepris d'étudier la composition des protéines associées à l'ADN dans le noyau cellulaire et les variations possibles de cette composition lorsqu'on passe d'une espèce animale à une autre espèce animale ou des cellules somatiques aux spermatozoïdes dans la même espèce. Les résultats que nous allons rapporter ici ont été obtenus récemment dans notre laboratoire par M^{lle} Knobloch et M. Matsudaira [43, 78], qui ont effectué l'étude chromatographique de nucléohistones d'origines fort diverses. Les chromatogrammes furent obtenus après hydrolyse des nucléoprotéines entières sans séparation préalable de l'ADN. On ne peut, en effet, séparer ADN et protéine sans risquer de perdre une certaine fraction de cette protéine qui, dès lors, ne correspond plus au produit naturel. Le volume d'hydrolysats utilisé dans chaque cas fut calculé de façon à avoir la même quantité d'ADN pour chacun des chromatogrammes réalisés simultanément sur le même papier. La planche I montre une étude simultanée, ainsi réalisée, de nucléohistones de différents organes de veau : thymus, foie, rein. L'intensité des taches des différents amino-acides et leur répartition sont tout à fait identiques dans les trois cas. Ainsi les nucléohistones semblent être les mêmes dans différents organes d'un même animal. Cette conclusion est tout à fait en accord avec les données récentes de Crampton, Stein et Moore [46]. Si nous comparons à présent les nucléohistones d'érythrocytes de différents Poissons, Batraciens et Oiseaux, ainsi que celle du thymus de

veau (planche II), nous constatons, ici aussi, une similarité remarquable de composition entre ces nucléoprotéines, qui cependant proviennent d'espèces animales bien différentes. L'analyse des acides aminés basiques confirme cette donnée (tableau III). Force

TABLEAU III. — Grammes d'acides aminés pour 100 g de protéine.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Carpe	Truite	Brochet	Veau	Poule	Canard	Tanche	Grenouille
	érythrocyte	érythrocyte	érythrocyte	thymus	érythrocyte	érythrocyte	érythrocyte	érythrocyte
	histone	histone	histone	histone	histone	histone	histone	histone
Arginine	13,5	13,5	11,4	12,6	13,3	13,0	"	12,8
Lysine	15,5	15,2	13,5	15,5	16,6	15,7	"	14,0
Histidine	2,5	2,5	1,7	2,4	2,5	2,4	"	2,9

nous est d'admettre que si les histones diffèrent d'une espèce à l'autre, ces différences doivent être faibles et au-dessous de la sensibilité de nos méthodes d'analyse.

La comparaison des nucléohistones avec les nucléoprotéines obtenues à partir du sperme des mêmes espèces apporte cette fois des données plus complexes : Kossel [44], dès le début du siècle, s'était attaché à étudier la composition des nucléoprotéines et avait montré que l'histone, protéine complexe des cellules somatiques, se simplifie considérablement lors de la formation des spermatozoïdes chez de nombreuses espèces ; elle devient très riche en acides aminés basiques : c'est une protamine. Kossel établit une classification des différents types de protamines trouvés chez différentes espèces de Poissons. Mais les méthodes brutales qu'il employait pour séparer la protamine de l'acide nucléique risquaient de modifier cette protéine en détruisant certaines fractions, si bien que les produits décrits et analysés par Kossel ne correspondent pas tous aux produits naturels, comme nous avons pu le montrer en effectuant des travaux du même ordre, mais par la méthode chromatographique portant sur le complexe nucléoprotéique entier. Nos résultats, bien qu'encore peu nombreux, nous ont conduit cependant à quelques intéressantes constatations (planche III) qui nous amènent à définir trois grands types dans la composition des nucléoprotéines du sperme de différents animaux : 1° Le type illustré par la carpe ou la grenouille, chez lequel la nucléoprotéine du sperme est identique à celle des cellules somatiques ; c'est une histone typique. 2° Le cas extrême de la truite, où la lysine et la plupart des acides aminés ont disparu à l'exception de l'arginine dont la quantité par rapport à l'ADN a augmenté de façon spectaculaire. 3° Enfin le cas inter-

médiaire du brochet, où l'arginine a augmenté de façon notable et où la lysine et la plupart des autres acides ont sensiblement diminué. L'analyse du contenu en arginine de ces différents types de spermes objective bien ces différences (tableau IV).

TABLEAU IV. — Grammes d'acides aminés pour 100 g de protéine.

	: Carpe	: Grenouille	: Brochet	: Truite	
	: Sperme	: Sperme	: Sperme	: Sperme	
Arginine	: 13,6	: 12,3	: 41,0	: 85	:
Lysine	: 16,5	: 15,2	: 9,9	: 0	:
Histidine	: 2,0	: 2,7	: 1,3	: 0	:

Quelle que soit la signification profonde sur le plan biologique de ces différences de composition dans les nucléoprotéines des spermatozoïdes, l'étude systématique de ces substances dans de très nombreuses espèces serait certainement intéressante et apporterait un élément de plus pour leur caractérisation.

II. — LES MICROORGANISMES.

Voici donc comment les travaux biochimiques récents sur l'ADN et les nucléoprotéines peuvent participer de près ou de loin à la notion d'espèce chez les êtres supérieurs. En ce qui concerne les bactéries, le problème se présente différemment et peut-être de façon plus complexe. En effet, chez ces microorganismes, la notion d'espèce est beaucoup moins évidente que chez les êtres supérieurs où les innombrables caractères morphologiques sautent aux yeux même du profane et conduisent dans bien des cas à une appréciation assez facile. L'univers des microorganismes est moins facile à explorer et à cataloguer et seul un petit nombre de spécialistes au monde est capable de classer les nombreuses espèces connues. Peut-être qu'ici la biochimie a eu dès le début une part plus grande : en effet, la gamme plus ou moins complète d'enzymes se traduisant par les différents caractères fermentaires d'un germe, les caractères antigéniques avec la composition des antigènes, polysaccharidiques, lipidiques, protéiques, ont été amplement utilisés pour la détermination des espèces bactériennes et sont désormais des tests classiques.

1° CYTOCHIMIE. — L'étude cytochimique des bactéries représente un aspect relativement récent de la biochimie bactérienne.

Ses buts essentiels sont l'interprétation sur le plan biochimique des réactions tinctoriales plus ou moins empiriques utilisées dans l'étude des bactéries et, d'autre part, l'essai de localisation dans telle ou telle partie de la cellule bactérienne de telle ou telle substance.

La réaction de Gram, par exemple, est universellement employée par les bactériologistes pour distinguer les deux groupes de bactéries Gram + et Gram —. Mais sur le plan biochimique, cette réaction n'a malheureusement pas une signification bien précise. Henry et Stacey [33], dès 1943, présentaient une série d'arguments tendant à prouver que la réaction Gram + caractériserait un complexe de ribonucléate de magnésium et de protéines concentré à la surface de la cellule. Cependant, un certain nombre d'auteurs (Dreyer, Scott et Walker [30], Dianzani et Maccari [21]) ont signalé une influence certaine de composants lipidiques. Salton [66] a montré effectivement que les bactéries à Gram positif ont une teneur en lipides beaucoup plus élevée que les germes à Gram négatif et insiste également sur l'importance que pourraient avoir certains composants protéiques de la membrane bactérienne. Enfin, Webb [81], utilisant l'action du lysozyme, évoque le rôle de polysaccharides dans la réaction de Gram.

Polysaccharides ? Protéines ? Lipides ? Ribonucléotides de magnésium ? Quel est l'agent chimique responsable de la réaction de Gram ?

Bartholomew et Mittwer [6], qui ont revu très soigneusement la question dans son ensemble, parviennent à la conclusion que le caractère positif de la réaction n'est pas dû à un certain constituant chimique bien déterminé. Le passage expérimental de l'état de Gram + à celui de Gram — par suppression d'un constituant ne doit pas faire conclure à l'intervention spécifique de ce constituant dans la réaction, trop de corps se comportant ainsi. Pour Bartholomew et Mittwer, toutes les bactéries, qu'elles soient Gram + ou Gram —, prennent le violet de gentiane par liaison ionique entre les groupements acides de la bactérie et les groupements alcalins du colorant. L'iode, ensuite, pénètre les deux types de germes en formant un complexe avec le colorant, complexe que va finalement dissocier l'alcool. Suivant la difficulté que rencontre l'alcool à traverser la membrane bactérienne, la décoloration est nulle ou complète.

PLANCHE I.

Pl. I. — Chromatogrammes de nucléohistones de thymus, foie et rein de veau (Volume d'hydrolysât rapporté à une même quantité d'ADN). Papier Whatman 1.
Solvant : butanol, 4 p. ; éthanol, 1 p. ; acide acétique, 1 p. ; eau, 2 p.

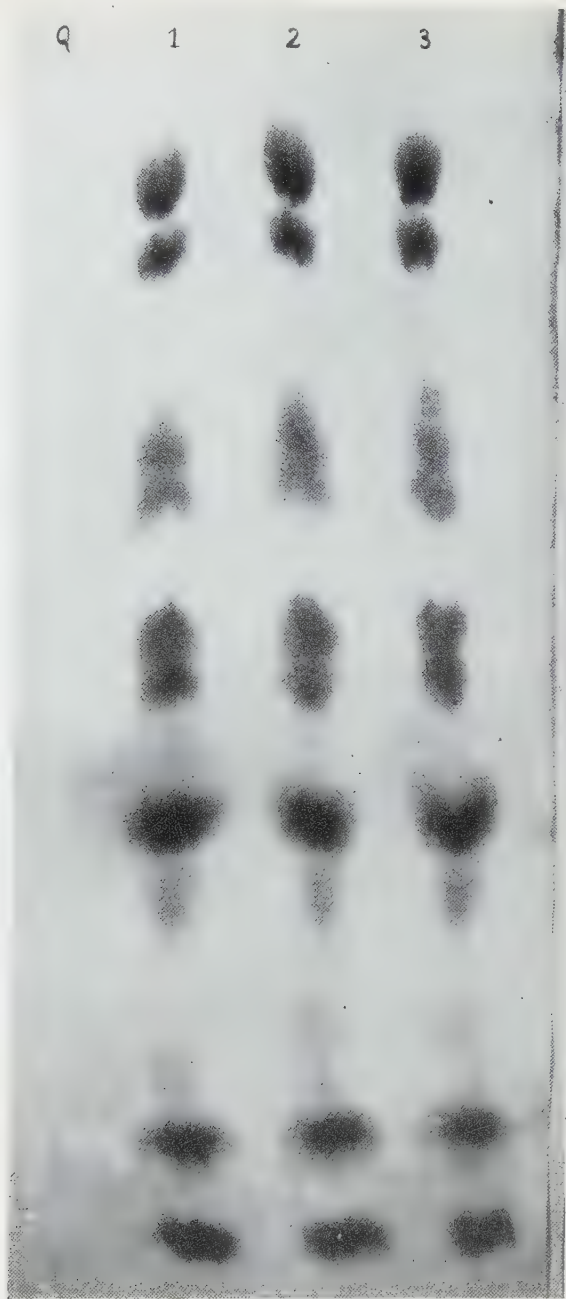


PLANCHE I.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

Pl. II. — Chromatogrammes de nucléohistones provenant de différents Vertébrés. (Volume d'hydrolysat rapporté à une même quantité d'ADN). 1. Nucléohistone d'érythrocyte de carpe ; 2. Nucléohistone d'érythrocyte de truite ; 3. Nucléohistone d'érythrocyte de brochet ; 4. Nucléohistone de thymus de veau ; 5. Nucléohistone d'érythrocyte de coq ; 6. Nucléohistone d'érythrocyte de canard ; 7. Nucléohistone d'érythrocyte de tanche ; 8. Nucléohistone d'érythrocyte de grenouille. Papier Whatman 1. Solvant : butanol, 4 p. ; éthanol, 1 p. ; acide acétique, 1 p. ; eau, 2 p.

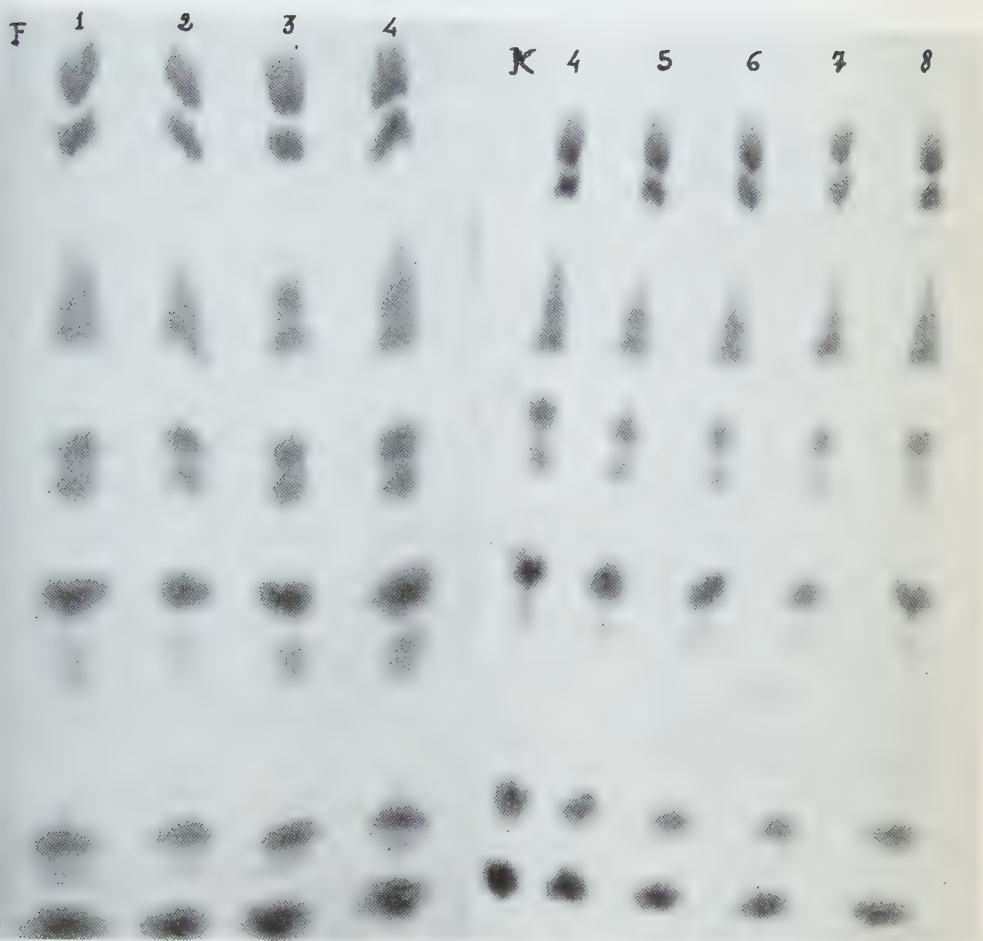


PLANCHE II.

Pl. III. — Chromatogrammes comparatifs de nucléohistones et nucléoprotamines de Poissons. (Volume d'hydrollysât rapporté à une même quantité d'ADN.)
1. Nucléohistone d'érythrocytes de carpe ; 2. Nucléoprotéine de sperme de carpe ;
3 Nucléohistone d'érythrocytes de brochet ; 4. Nucléoprotamine de sperme de brochet ; 5. Nucléohistone d'érythrocytes de truite ; 6. Nucléoprotamine de sperme de truite. Papier Whatman 1. Solvant : butanol, 4 p. ; éthanol, 1 p. ; acide acétique, 1 p. ; eau, 2 p.

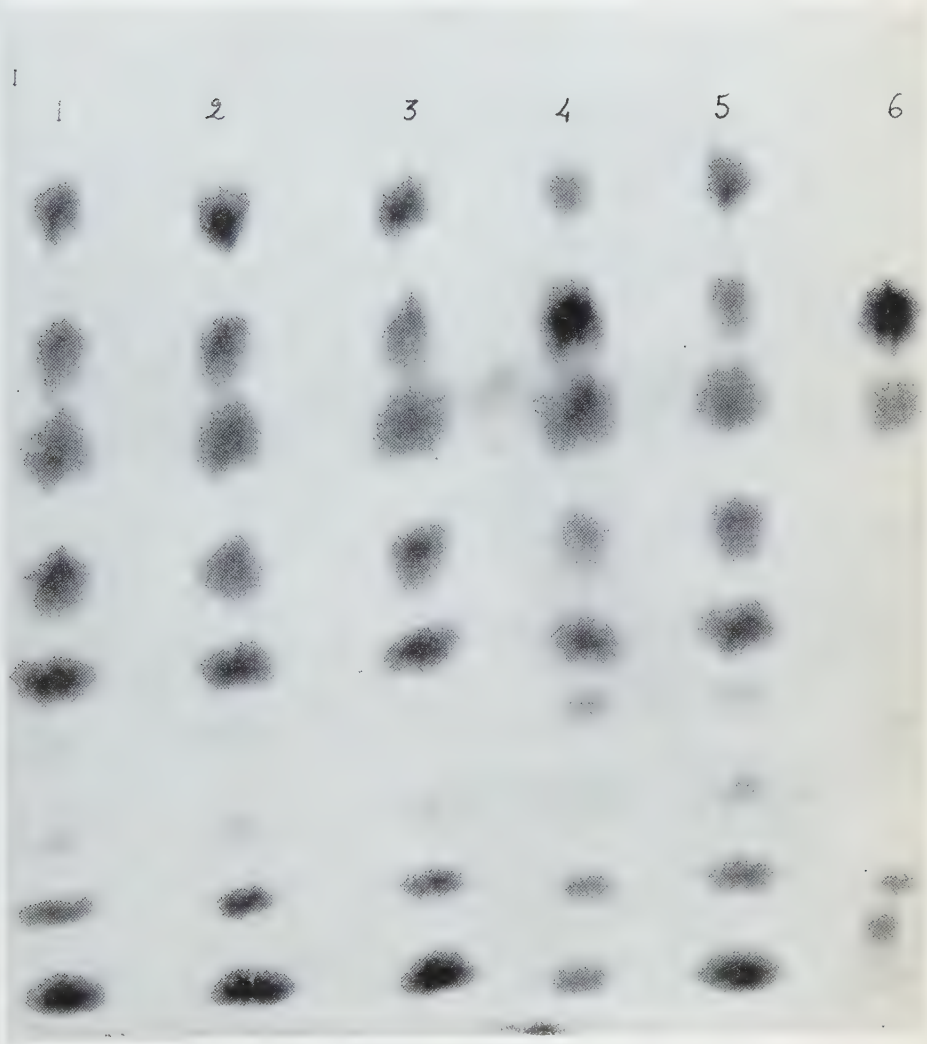


PLANCHE III.

Ainsi, faute d'explication biochimique précise, la signification profonde du Gram nous échappe ; il ne ferait que révéler certaines propriétés physico-chimiques constantes de la membrane bactérienne.

En ce qui concerne la localisation cytochimique de certaines substances dans les bactéries, l'emploi du Soudan III pour la mise en évidence des lipides a conduit Burdon [12] à des constatations intéressantes : la membrane est colorée, mais aussi des inclusions cytoplasmiques dont l'abondance caractérise certains microorganismes (*Clostridium*, *Corynebacterium* et *Mycobacterium*). Ces inclusions peuvent manquer totalement ou n'être présentes qu'en petites quantités chez d'autres germes (staphylocoques, streptocoques, pneumocoques). Burdon signale d'ailleurs que les lipides sont en général plus abondants et présents avec plus de régularité chez les bactéries Gram +.

Il existe également des techniques spécifiques applicables aux bactéries pour la mise en évidence des polysaccharides (méthodes de Hotchkiss [34] et Mc Manus [52] et sa modification par Jarvi et Levanto [37]), mais il n'existe pas de travaux systématiques sur différentes espèces bactériennes à ce sujet. On peut enfin mettre en évidence cytochimiquement certains enzymes dans le cytoplasme de la bactérie ou au niveau de certains granules cytoplasmiques. Les phosphatases et les lipases (Bayliss, Glick et Siem [7]) ont été ainsi localisées chez certains germes par les méthodes mises au point par Gomori. La cytochrome-oxydase a été mise en évidence par Mudd et coll. [58] chez de nombreuses bactéries par la réaction du Nadi.

Mais tous ces essais cytochimiques sont encore très fragmentaires et ne sauraient être développés de façon intensive. On conçoit en effet la difficulté que l'on rencontre à appliquer des méthodes cytochimiques valables à des organites aussi petits que les bactéries et dont la cytologie même est encore mal connue. Si jamais les données cytochimiques sur les bactéries peuvent un jour être utilisables pour la notion d'espèce, ce jour est à coup sûr fort lointain. Il n'en est peut-être pas de même en ce qui concerne l'étude de l'ADN et des nucléoprotéines, qui, nous l'avons vu, prennent une importance considérable en génétique chez les êtres supérieurs.

Mais, si la notion d'ADN facteur héréditaire a réussi à s'imposer chez la plupart des biologistes et s'est développée à ce point, c'est justement grâce à la découverte chez la bactérie de l'activité transformante que l'ADN d'une souche bactérienne peut avoir sur les caractères héréditaires d'une souche voisine à qui elle imprime un ou plusieurs caractères nouveaux empruntés à la souche donneuse d'ADN. Les expériences sur les pneumo-

coques initiées par Griffith [32] et développées magnifiquement par Avery et son école [4] sont désormais classiques. Boivin [10] avait décrit des phénomènes du même genre chez *Escherichia coli*, mais la souche « réceptrice » qu'il avait isolée a été perdue, et des transformations ont été réalisées chez d'autres espèces bactériennes : *Shigella paradyssenteriae* [83], *Proteus* X 19, *Salmonella*, *Staphylococcus* [18, 19, 20], bacille tuberculeux [38], etc., mais n'ont pas été confirmées. Ainsi, outre le pneumocoque, deux espèces seulement présentent des phénomènes de transformation constamment reproductibles : *Hemophilus influenzae* (Alexander et Leidy [1, 2]) et *Neisseria meningitidis* (Alexander et Redmann [3]). Pourquoi le phénomène de transformation pourtant connu depuis plus de dix ans est-il resté limité à un si petit nombre d'espèces bactériennes ? Cette question est assez troublante et Zamenhof y répond de façon très convaincante dans une revue récente [85]. Il fait remarquer tout d'abord que beaucoup d'espèces libèrent dans leur milieu de culture des désoxyribonucléases puissantes. Dans ces conditions, il est évident que le facteur transformant sera détruit rapidement avant d'avoir aucun contact avec les cellules bactériennes en expérience. D'autre part, les cellules réceptrices peuvent être tout à fait imperméables au principe transformant qui ne peut absolument pas franchir la membrane. Enfin, la troisième raison avancée par Zamenhof et qui n'est pas moins importante que les deux premières est un facteur humain. Le succès dans la recherche d'un nouveau phénomène de transformation est conditionné par une intime connaissance de l'organisme utilisé et des propriétés de l'ADN ainsi que par des années de patient labeur.

Il n'est donc pas exclu d'envisager que d'autres espèces bactériennes peuvent présenter le phénomène de transformation et on peut espérer qu'une meilleure connaissance du phénomène pourra permettre de le généraliser à de nombreuses autres espèces. Quoi qu'il en soit, ce phénomène jusqu'à présent n'a été possible qu'à l'intérieur d'une même espèce. Le passage d'une espèce bactérienne à une autre n'a jamais pu être réalisé, si ce n'est la transformation d'une variante de *Bacteridium anthracis* non encapsulée sous l'effet d'un extrait de *Bacillus mesentericus* encapsulé, et la transformation inverse de *Bacillus mesentericus* non encapsulé sous l'effet d'un extrait de *Bacteridium anthracis* encapsulé [51] ; mais cette expérience n'a pas été confirmée. Des travaux plus récents sur *Hemophilus influenzae* dus à Schaeffer et Ritz [68] d'une part, à Leidy et Alexander [49] d'autre part, montrent que des transformations interspécifiques sont possibles dans ce genre. Cependant, leur fréquence est beaucoup plus faible que celle des transformations intraspécifiques. Les expériences de Schaeffer [67] avec des ADN marqués au radiophosphore

montrent que cette faible fréquence de transformation interspécifique n'est pas due à une moindre pénétration du facteur transformant dans les bactéries. La pénétration de l'ADN marqué se révélant la même pour les différentes espèces en expérience, il faut donc admettre que l'empêchement du processus doit s'effectuer à l'intérieur de la bactérie. La transformation bactérienne dépendrait de l'appariement de l'ADN transformant avec une structure complémentaire de la bactérie réceptrice, la fréquence de la transformation étant en rapport avec l'étendue de cette synapse. En tout cas, un tel phénomène ne serait possible qu'entre espèces extrêmement voisines et indiquerait des affinités très grandes entre ces deux espèces.

2° L'ADN ET LES NUCLÉOPROTÉINES BACTÉRIENNES. — Si l'ADN chez les bactéries a montré dès longtemps une activité transformante incontestable sur les caractères héréditaires, l'étude de cet ADN lui-même, de son comportement et de sa structure physico-chimique est beaucoup moins avancée que chez les êtres supérieurs. Nous avons vu, en effet, que chez ceux-ci le contenu en ADN des noyaux normaux au repos représentait une constante caractéristique de l'espèce. Une telle étude est-elle possible chez les bactéries ? A vrai dire, nous n'avons à l'heure actuelle que fort peu de résultats à ce sujet. En effet, si le dosage d'ADN chez les bactéries est relativement facile, par contre la numération des bactéries est bien plus délicate et pénible que celle de noyaux isolés de tissus et comporte plus de causes d'erreur. D'autre part, si l'on considère une culture de bactéries, il s'agit le plus souvent d'un mélange de cellules en division, de cellules se préparant à la division, et de cellules au repos ou en train de mourir. Enfin la définition du noyau bactérien n'est pas tout à fait précise ; à la phase de grande multiplication, en effet, les bactéries présentent souvent de nombreux éléments chromatiques en nombre assez variable qui pourraient représenter des chromosomes. Dans ce cas, l'évaluation de l'ADN par bactéries est possible, celle de l'ADN par noyau ne saurait qu'être arbitraire et basée sur une définition provisoire du noyau de la bactérie. Et d'ailleurs, comme l'ont fait remarquer R. Tulasne et C. Vendrely [76], il doit exister dans la plupart des cas dans les bactéries une quantité de chromatine beaucoup trop grande, une sorte de polyploidie normale, comme nous le verrons en étudiant tout à l'heure les formes L. Un seul granule bien inférieur en taille au noyau présumé de la bactérie suffit à assurer la continuité des caractères de l'espèce et contient donc tout le stock de gènes de la bactérie. Ce luxe de matériel génique, nous le retrouvons du haut en bas de l'échelle des êtres et il est particulièrement évident chez certains Protozoaires où il est objectivé par la sépa-

ration du micronucléus, servant à la reproduction et contenant le nombre diploïde de chromosomes, et le macronucléus, hautement polyploïde, servant à la vie végétative et susceptible d'être détruit et reconstruit au cours du cycle vital de ces micro-organismes. En ce qui concerne les bactéries, il semble exister un certain rapport entre le volume du cytoplasme bactérien et celui du noyau. Il doit exister un équilibre nucléo-plasmatique qui se maintiendrait par la multiplication du matériel nucléaire quand la bactérie augmente de taille, ce qui est particulièrement net dans les formes géantes que présentent les *Proteus*, *B. megaterium* et parfois certains cocci au début de la phase de multiplication exponentielle.

Il résulte de tout ceci qu'une détermination du contenu du noyau bactérien en ADN, pour être valable, doit porter sur des bactéries en phase de repos, au moment où elles ne se divisent pratiquement plus. La synchronisation des cycles de division chez les bactéries (Hotchkiss [35], Lark et Maaløe [45, 46, etc.]) peut fournir aussi un moyen élégant d'obtenir un grand nombre de bactéries toutes comparables en ce qui concerne l'état physiologique de leur noyau. Dans notre laboratoire, M^{me} Vendrely (1) a mis au point un procédé de synchronisation des divisions en mettant des colibacilles en phase de multiplication dans du sérum physiologique à 37° pendant trente à soixante minutes, puis en les refroidissant ; les germes deviennent alors très petits et pour la plupart mononucléés. M^{me} Palmade (1) a trouvé chez ces germes 9×10^{-12} mg d'ADN par bactérie et un poids sec de $1,8 \times 10^{-10}$ mg. Si on les remet sur un milieu nutritif à 37°, le contenu en ADN de ces germes passe à 17×10^{-12} mg et leur poids sec à $3,5 \times 10^{-10}$ mg en quarante minutes. On assiste donc ici à la duplication concomitante de la masse totale des germes et de leur contenu en ADN.

On peut donc retenir le chiffre de 9×10^{-12} mg d'ADN pour le colibacille. Des dosages sur *B. megaterium* et sur *Proteus* donnent des résultats comparables quoique un peu plus élevés : entre 10 et 11×10^{-12} mg par bactérie. Webb [82] donne pour *Welchia perfringens* la valeur de $24,5 \times 10^{-12}$ mg, ce qui est considérablement plus élevé que chez les germes précédents. Caldwell et Hinshelwood [43] indiquent pour *Bacillus lactis aerogenes* une teneur en ADN par bactérie de 20×10^{-12} mg. Cette teneur reste constante durant la pousse des cultures malgré de fortes variations dans la proportion de l'azote total cellulaire. Ogur [59] et ses collaborateurs ont trouvé chez la levure une teneur d'ADN de $6,2 \times 10^{-12}$ mg. Enfin Morse et Carter [56] signalent chez *E. coli* que le mutant B/r contient trois à quatre

(1) Résultats non publiés.

fois plus d'ADN que la souche parente B. Il pourrait donc y avoir, comme chez les êtres supérieurs, passage d'une variété à une autre par polyploidie.

Comme on le voit, les résultats sur la teneur absolue en ADN chez différentes espèces de bactéries sont encore trop rares pour qu'on puisse décider si cet élément pourra être utilisé dans leur classification. Nous pouvons remarquer ici cependant que le noyau des bactéries contient considérablement moins d'ADN que le noyau des Mammifères par exemple. Déjà, en 1949, Boivin, R. et C. Vendrely [41] avaient calculé que le noyau bactérien doit contenir cent à mille fois moins d'ADN que le noyau de l'homme. Cette évaluation semble donc être tout à fait valable. Cette valeur s'abaisse encore si l'on passe aux virus : Cohen et Arbo-gast [45] ont calculé qu'une particule de bactériophage T2r contenait $0,36 \times 10^{-12}$ mg et une particule de bactériophage T6r $0,34 \times 10^{-12}$ mg, ce qui représente beaucoup moins que les teneurs trouvées chez les bactéries. Des valeurs de l'ordre de $0,007 \times 10^{-12}$ mg ont été trouvées pour le virus de la grippe et le virus du papillome du lapin. Ici donc, lorsqu'on passe des êtres supérieurs aux bactéries et des bactéries aux virus, la simplification du stock génique est reflétée nettement par la diminution de la teneur en ADN par noyau.

3° DONNÉES ANALYTIQUES SUR L'ADN. — Nous avons vu plus haut que les travaux de Chargaff et coll., sur un grand nombre d'échantillons d'ADN provenant des espèces animales les plus variées et même de matériel végétal, avaient mis en évidence un rapport caractéristique des bases puriques et pyrimidiques entre elles, à l'intérieur d'une même espèce. Chez les bactéries, on a pu vérifier également que le rapport entre bases de même type dans les différents ADN semblent indépendant du milieu de culture ou de la température (Smith et Wyatt [70], Reddi [63], Ki Yong Lee, Wahl et Barbu [39]). Ce rapport est également le même quel que soit le procédé d'isolement, procédé utilisant le lysozyme par lequel on peut recueillir quantitativement l'ADN, ou procédé par broyage qui n'extrait qu'une partie de l'ADN [39].

On peut donc admettre que ces rapports sont susceptibles de caractériser une espèce donnée de bactérie. Nous avons constaté que chez les êtres supérieurs, les rapports entre adénine/guanine, cytosine/thymine variaient légèrement suivant les espèces, mais étaient toujours supérieurs à l'unité. C'est le type AT d'ADN à prédominance d'adénine et de thymine qui caractérise les êtres supérieurs. Chez les microorganismes, il en est autrement : on peut en effet trouver parmi eux des espèces à ADN de type GC, où la guanine et la cytosine prédominent, par exemple *Serratia marcescens* dont les rapports adénine/guanine et thymine/cytosine

sont respectivement 0,76 et 0,63, *Mycobacterium tuberculosis* où ces rapports sont de 0,62 et 0,58 [84]. Un travail récent de Ki Yong Lee, Wahl et Barbu [39] a été effectué sur un nombre considérable d'espèces de microorganismes et permet enfin d'entrevoir un lien entre les données analytiques et la classification des bactéries. En effet, les résultats de ces auteurs, portant sur 60 souches, font apparaître plusieurs points très précis (tableau V).

1° Le rapport adénine + thymine/guanine + cytosine est bien constant par espèce, aux erreurs d'expérience près, qu'il s'agisse de souches natives ou de mutants sélectionnés.

2° D'autre part, ces auteurs constatent que chez la plupart des espèces appartenant au même genre de la classification de Bergey [9] le rapport est du même ordre de grandeur. Quelques exceptions semblent particulièrement intéressantes ; ainsi, *Micrococcus lysodeikticus* a un rapport de 0,4, extrêmement différent de celui des autres espèces de *Micrococcus* examinées qui est de 2 environ. Or Prévot [61] classe *Micrococcus lysodeikticus* dans un genre et même dans une tribu différente, celle des Sarcines. Comme le rapport trouvé pour les Sarcines est comparable à celui trouvé pour *Micrococcus lysodeikticus*, ces résultats parlent en faveur de l'opinion de Prévot.

3° Enfin dans chaque famille certains genres ont des valeurs très proches, d'autres ont des valeurs très éloignées. Ainsi dans le genre *Diplococcus*, *Diplococcus pneumoniae* a un rapport de 1,6 (Daly et coll. [47]), alors que deux autres genres décrits par Prévot [61] et que Bergey [9] rattache à la même famille : *Ramibacterium ramosum* et *Bifidibacterium bifidum*, ont respectivement un rapport de 2,32 et 0,74.

En définitive, la valeur du rapport $A + T/G + C$ qui s'étale entre 0,4 et 2,7 paraît donc effectivement être un caractère lié à l'espèce et peut représenter un critère supplémentaire de valeur pour une classification en genre.

Enfin Ki Yong Lee, Wahl et Barbu signalent que le caractère Gram ne paraît pas en relation directe avec la valeur du rapport, de même que le caractère aérobic ou anaérobic des bactéries.

Ainsi l'étude de l'ADN des bactéries et du rapport de ses bases peut devenir une donnée utile dans la classification. Nous ne pouvons rien ajouter au sujet des désoxyribonucléoprotéines bactériennes. En effet, on n'a jamais pu les isoler, soit que ces nucléoprotéines n'existent pas, soit que leur extrême labilité les amène à se dissocier dès la mort de la bactérie. Belozersky et ses collaborateurs [8], en se basant sur les résultats de dosages d'acides aminés basiques chez les bactéries, concluaient à l'absence de protéines de caractère basique (protamines et histones) chez les bactéries.

TABLEAU V. — Contenu en bases puriques et pyrimidiques
des acides désoxyribonucléiques des bactéries.

Matériel	Adénine	Thymine	Guanine	Cytosine	A + T G + C	Gram
<u>Germes aérobies</u>						
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	25,3	25,1	25,2	24,4	1,01	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	24,6	24,9	25,5	25,0	1,00	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	24,6	25,2	25,4	24,8	0,99	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	24,9	25,1	25,0	25,0	1,00	-
<i>Salmonella enteritidis</i> résistante au phage D ₄	24,4	25,7	24,7	25,2	1,00	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A	24,8	25,3	24,9	25,0	1,00	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	24,8	25,0	26,1	24,1	0,99	-
<i>Shigella paradysenteriae</i> Flexner Y ₆ R ⁰	24,9	25,8	24,8	24,5	1,02	-
<i>Shigella paradysenteriae</i> Flexner Y ₆ R [*]	25,8	25,0	25,3	23,9	1,03	-
<i>Micrococcus pyog.</i> Oxf.	34,1	32,2	15,0	15,7	2,26	+
" " 1161	35,7	33,4	16,0	14,9	2,26	+
" " 1149	34,2	34,6	16,1	15,1	2,20	+
" " 145	34,4	34,2	16,2	15,2	2,18	+
" " m 320	34,2	33,8	15,6	16,4	2,13	+
<i>Strep. pyog.</i> (gr. A)	33,4	33,0	16,6	17,0	1,97	+
" <i>zymogenes</i> (gr. D)	33,1	33,3	16,2	17,4	1,97	+
" <i>faecalis</i> (gr. D)	33,4	32,0	16,9	17,7	1,89	+
<i>B. cereus</i> alesti	33,5	33,2	17,3	16,0	2,00	+
<i>B. cereus</i> A ₂₅	32,3	33,2	17,9	16,6	1,90	+
<i>B. cereus</i> alesti (mutant) (31ème passage soude)	31,9	32,4	18,0	17,7	1,80	+
<i>B. cereus</i> alesti (mutant)	32,0	31,7	17,6	18,7	1,75	+
<i>B. thuringiensis</i> amer.	32,2	31,9	18,1	17,8	1,78	+
<i>Pasteurella aviseptica</i>	32,0	31,7	18,2	18,1	1,75	-
<i>Pasteurella bovisseptica</i>	31,0	31,4	18,8	18,8	1,66	-
<i>Proteus vulgaris</i>	32,0	31,5	18,6	17,9	1,74	+
<i>B. megatherium</i>	31,8	30,6	19,1	18,5	1,66	+
<i>B. subtilis</i>	29,9	28,7	21,0	21,4	1,36	+
<i>Vibrio cholerae</i>	28,8	27,9	20,0	23,3	1,31	-
<i>M. lysodeikticus</i>	14,4	13,7	37,3	34,6	0,39	+
<i>Sarcina flava</i>	15,6	15,8	33,5	35,1	0,46	+
<i>Sarcina lutea</i>	18,7	17,4	32,4	31,5	0,56	+
<i>Pseudomonas tabaci</i>	16,2	16,4	33,7	33,7	0,48	-
" <i>aerugin.</i> S I	17,0	16,9	34,2	31,9	0,51	-
" " 9 W	17,5	17,8	34,1	30,6	0,55	-
" " A 22	18,0	18,0	33,1	30,9	0,56	-
" " 22 W	17,8	17,8	33,1	31,3	0,56	-
" <i>fluorescens</i>	18,2	18,8	33,0	30,0	0,59	-
<i>Agrobact. tumefaciens</i> (non tumorigène)	21,2	20,1	30,6	28,1	0,70	-
<i>Agrobact. tumefaciens</i>	21,7	20,1	30,2	28,0	0,72	-
<i>Serratia marcescens</i>	21,1	20,9	29,0	29,0	0,71	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>	20,5	22,4	29,3	27,8	0,75	-
<i>Corynebact. diphtheriae</i>	24,2	23,9	24,8	27,1	0,92	+
<u>Germes anaérobies</u>						
<i>Welchia perfring.</i> (Fred)	36,9	36,3	14,0	12,8	2,7	+
<i>Ranibacterium ramosum</i>	35,1	34,8	14,9	15,2	2,32	+
<i>Plectridium saprogenes</i>	34,7	35,0	16,0	14,3	2,30	+
<i>Ristella clostridioformis</i>	34,4	34,4	15,8	15,4	2,20	-
<i>Fusiformis fusiformis</i>	34,8	33,7	15,7	15,8	2,17	-
<i>Clostr. valerianicum</i>	35,1	33,1	16,2	15,6	2,14	+
<i>Clostr. bifermentans</i>	34,0	33,5	17,0	15,5	2,08	+
<i>Strep. foetidus</i>	32,1	34,3	16,8	16,8	1,97	+
<i>Micr. asaccharolyticus</i>	31,2	34,7	18,8	15,3	1,91	+
<i>Veillonella parvula</i>	31,7	31,8	18,5	18,0	1,74	-
<i>Ristel. insolit.</i> N.I. 12	29,3	29,5	20,7	20,5	1,43	-
" " I.S. 9	28,2	28,6	23,2	20,0	1,31	+
<i>Corynebacterium acnes</i>	26,3	25,8	21,1	26,8	1,08	+
<i>Bifidibact. bifidum</i>	21,9	20,5	28,3	29,3	0,74	+
<i>Corynebacterium parvum</i>	21,5	20,3	29,8	28,4	0,72	+
<i>Fusiformis polymorphus</i>	20,7	20,4	29,9	29,0	0,70	-

4° LES FORMES L. — Il nous reste à envisager maintenant le problème des formes L des bactéries dont la nature et la signification restent encore un sujet de controverse pour les spécialistes de la question et dont l'existence, en marge des bactéries normales, permet d'envisager d'une manière nouvelle différents aspects de la biologie bactérienne, et en particulier de la pathologie, de la taxonomie et de la filiation éventuelle entre les bactéries et les virus. Les grands spécialistes de l'étude des formes L sont peu nombreux au monde : ce sont en Angleterre Klieneberger-Nobel, en Amérique Dienes et en France Tulasne.

Que sont les formes L ? Ce sont des variantes stables des bactéries qui diffèrent profondément des germes qui leur ont donné naissance par leur morphologie, leur cycle évolutif et leurs propriétés biologiques et qui présentent, quel que soit le type de bactéries dont elles sont issues, une ressemblance frappante à tous égards avec les organismes du type de la péripneumonie des bovidés et des organismes qui leur sont assimilés. Comme le souligne Tulasne, « les variantes L des bactéries représentent une sorte de points communs qui semblent marquer l'unité bactérienne ». Ces formes apparaissent spontanément sous l'influence d'actions nocives, ou expérimentalement par induction avec des substances chimiques. L'action des antibiotiques permet de plus de les isoler facilement des formes normales, car elles sont résistantes à certains d'entre eux.

C'est en 1935 que Klieneberger-Nobel [41], du Lister Institute, observa pour la première fois dans des cultures de *Haverhillia moniliformis* un organisme inconnu, dont les dimensions, la morphologie et la forme des colonies différaient totalement de celles de *Haverhillia moniliformis*, mais présentaient par contre tous les caractères des microbes de la péripneumonie des bovidés et de l'agalaxie contagieuse des chèvres et des moutons. Elle leur donna le nom d'organismes L (Lister) qui leur est resté. C'étaient, comme devait le démontrer Dienes [22], des variantes de *Haverhillia moniliformis*. Ces formes furent bientôt observées chez *E. coli*, *Haemophilus influenzae* et *parainfluenzae*, *Flavobacterium* et *Spherophorus funduliformis* (Dienes [23, 25]), puis chez les cocci : gonocoques (Dienes [24], Tulasne [73]), streptocoques (Dienes [29]), chez des bacilles aérobies non sporulés : *Proteus*, *Salmonella*, diverses *Shigella* (Dienes [22, 23, 26, 27], Tulasne [74], Lavillaureix [48]), des vibrions (Minck [53]), des bacilles anaérobies : *Spherophorus funduliformis*, *Plectridium tetani* (Dienes [28]).

C'est la pénicilline (Pierce [60]) qui est actuellement la substance la plus utilisée pour provoquer chez les bactéries la production de formes L, mais d'autres facteurs peuvent aussi intervenir. En général, tout agent nocif capable de provoquer l'apparition de

formes géantes à partir de bactéries semble pouvoir déterminer dans certaines conditions la transformation L complète, que ce soit l'accumulation dans les cultures de déchets métaboliques, les hautes concentrations de glycine, la carboxyméthoxylamine, les acides aminés comme la DL-méthionine, le complexe anticorps-alexine, etc.

Tulasne [74] a décrit de façon complète les divers processus de la transformation L. Cet auteur distingue un cycle L préparatoire durant lequel la réversion des formes L vers la forme bactérienne normale est encore possible, puis la fixation définitive de la forme L.

Le cycle préparatoire comprend l'évolution des formes bactériennes normales vers des formes géantes, des boules pouvant atteindre 15 à 25 μ de diamètre, et donnant naissance à des formes naines de 200 à 300 m μ de diamètre qui sont susceptibles de redevenir des formes normales si l'action nocive ayant déterminé la transformation disparaît.

La forme géante a un cytoplasme visqueux, sans enveloppe organisée et dans lequel s'agitent de nombreuses granulations très petites qui sont riches en ADN. Ces granulations sont libérées dans le milieu par éclatement des parois de la forme géante et deviennent des formes naines. Ces formes naines se reproduisent de façon complexe en se transformant en forme géantes qui donneront à leur tour des formes naines. Si les conditions défavorables à la végétation des bactéries persistent assez longtemps, la réversion des formes L vers les formes bactériennes normales devient impossible. La soudaineté de ce processus de « fixation » des formes L dans un état irréversible amène Tulasne à le considérer comme analogue à un phénomène de mutation.

En ce qui concerne leur constitution antigénique, les formes L semblent posséder dans l'ensemble les mêmes facteurs somatiques que les formes normales correspondantes. Cependant les proportions relatives de ces facteurs, leur quantité totale, doivent différer chez les formes naines, certains de ces facteurs peuvent même manquer totalement chez ces dernières. Tulasne [73] a constaté chez certains *Proteus* que l'antigène H bactérien avait disparu dans les formes L.

L'équipement enzymatique des formes L est à peu près le même que celui des formes normales, mais les réactions diastasiques sont alors plus faibles et plus lentes à déclencher. Enfin le pouvoir pathogène des formes L est, pour la plupart d'entre elles, faible ou nul.

Minck et Fruhling [54] ont pu provoquer par inoculation sous-cutanée ou miéux intracutanée de formes L des lésions locales se présentant comme des abcès torpides tout à fait particuliers

dont le centre est rempli d'un magma caséux bourré de granulations basophiles. Ces granulations sont-elles des formes naines ? On ne saurait l'affirmer, car l'ensemencement du pus ne donne lieu à aucune culture. Tulasne a obtenu des abcès du même type par inoculation intratesticulaire.

Cependant, on ne doit pas généraliser la notion de perte totale de virulence des bactéries après leur passage à la forme L, car Lavillaureix [47] a découvert des souches de formes L issues d'un vibrion des eaux et qui, fixées de façon irréversible depuis près de quatre ans, se montrent hautement pathogènes et provoquent la mort des animaux (souris, lapin) par inoculation. On peut les retrouver dans les cadavres des animaux et les isoler par culture.

Du point de vue biochimique, nous avons pu montrer avec Tulasne [79] que les formes L diffèrent des bactéries dont elles sont issues par une richesse considérable en lipides complexes. D'autre part, la teneur en ADN des formes L est supérieure à la teneur en ARN, alors que chez les bactéries l'ARN se trouve toujours en quantité supérieure. Ceci est évidemment en rapport avec la réduction considérable du cytoplasme des formes naines qui sont presque réduites à l'état de noyau. Il importe d'ailleurs de souligner que les dosages sur les formes L ne sauraient être d'une précision absolue. En effet, ces organismes, très instables, peuvent libérer une partie de leur substance au cours de la récolte et des lavages qu'on doit leur faire subir. Les dosages peuvent donc varier suivant la méthode utilisée pour recueillir ces formes. Cependant nos dosages portant sur plusieurs récoltes ont indiqué chaque fois les rapports que nous avons signalés.

Voici donc comment se présentent ces mystérieuses formes L. Les grandes similitudes qu'elles offrent avec les microbes du type de la péripneumonie des bovidés (PPLO) ont amené certains auteurs à concevoir que ces PPLO pourraient représenter des formes L fixées de bactéries banales ou non identifiées. En effet, les PPLO comme les formes L présentent des formes naines et des formes globuleuses subissant un cycle évolutif typique tel que nous l'avons décrit ci-dessus. On peut en effet imaginer que les PPLO apparus dans l'organisme humain ne seraient autres que des formes L fixées dont la formation à partir de bactéries aurait été provoquée par une thérapeutique maladroite ou insuffisante par les antibiotiques par exemple. Ce point est évidemment très important à fixer du point de vue de la pathologie et, d'autre part, sur le plan de la biologie générale, on pourrait considérer ces PPLO comme un maillon d'une chaîne évolutive conduisant des bactéries aux virus par simplification et dégradation.

Tulasne est fortement partisan du rattachement des PPLO aux formes L fixées. Ses arguments portent sur la remarquable simi-

litude morphologique de ces deux organismes. Cependant, Klieneberger-Nobel [42] souligne certaines différences morphologiques et métaboliques qui parlent en faveur de l'autonomie des PPLO qui constitueraient bien, selon elle, une classe particulière de microbes.

Que les formes L soient assimilables ou non aux PPLO, elles constituent de toute façon un sujet d'étude passionnant, un peu en marge de la bactériologie classique. On peut les considérer comme des formes de résistance bactérienne vis-à-vis de certains agents nocifs.

Notons en outre que, comme l'ont montré Smith [69], Prévot et Raynaud [62] et S'empen [71], les formes géantes peuvent résulter de la fusion de deux bactéries, il y a donc possibilité de recombinaisons géniques dans ces conditions. Klieneberger-Nobel [40] considère en effet le cycle L comme un processus de régénération impliquant probablement des recombinaisons géniques. Mais il ne s'agit là encore que d'une hypothèse.

D'autre part, la simplification considérable de la forme naine, qui n'est pratiquement qu'un minuscule appareil nucléaire revêtu de très peu de cytoplasme, démontre qu'il doit exister chez la bactérie normale une sorte de polyploidie plus ou moins accentuée, puisque l'appareil nucléaire de la cellule bactérienne est souvent bien plus gros que la forme naine, qui pourtant contient tout l'équipement génique nécessaire à la bactérie normale.

Récemment, Tulasne et Lavillaureix [75] ont découvert dans des cultures de vibrions soumises à diverses influences des colonies de formes géantes (8 à 20 μ) pures définitivement fixées. Ces formes se multiplient par division indirecte sans apparition de formes granulaires. Leur signification est encore indéterminée.

Au cours de cet exposé nous nous sommes efforcé de rechercher comment les données biochimiques nouvelles concernant principalement les acides nucléiques et leur complexe protéique peuvent contribuer à éclairer la notion d'espèce et s'intégrer à la masse importante des critères déjà établis. On nous pardonnera cette limitation du sujet au domaine des acides nucléiques dont l'intérêt ne fait que grandir à l'heure actuelle et qui ont toujours représenté pour nous un sujet d'étude essentiel. Il est évident que les données que nous avons exposées sont encore bien fragmentaires ; le plus souvent, le chemin est à peine indiqué, presque pas exploré, dans le domaine des bactéries. Mais les points déjà établis dans celui des êtres supérieurs doivent orienter les recherches d'une façon assez sûre. Les progrès de la cytochimie, l'étude de la teneur en ADN par noyau des cellules, l'étude analytique fine de cet ADN par chromatographie, tous

ces aspects relativement récents de la biochimie peuvent et doivent apporter leur contribution à la notion d'espèce, et, lorsque enfin la nature semble se complaire à créer des monstres comme les formes L, si différentes des formes bactériennes classiques, ce n'est peut-être pas uniquement pour nous irriter par des énigmes, mais peut-être pour nous montrer un des chemins qu'a pu suivre l'évolution des microorganismes.

SUMMARY

THE NOTION OF SPECIES STUDIED IN THE LIGHT OF SOME RECENT BIOCHEMICAL DATA. THE L CYCLE.

In recent years, taxonomic studies on higher organisms have been based on deoxyribonucleic acid contained in their cellular nuclei. The comparative study of the proportions of nitrogen constituents (purine and pyrimidin bases) of nucleic acids from different species also yield very interesting data.

In the present paper, the importance of such studies on bacterial DNA for the classification of microorganisms is discussed.

The L forms of bacteria and their likeness with the bovine peripneumonia organisms constitute a problem of classification which is not yet solved.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALEXANDER (H. E.) et LEIDY (G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **73**, 485.
- [2] ALEXANDER (H. E.) et LEIDY (G.). *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 345.
- [3] ALEXANDER (H. E.) et REDMANN (W.). *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 797.
- [4] AVERY (T. O.), McLEOD (C. M.) et McCARTY (M.). *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 137.
- [5] BALDWIN (E.). *An introduction to comparative biochemistry*, Cambridge Univ. Press, 1948.
- [6] BARTHOLOMEW (J. W.) et MITTWER (T.). *Bact. Rev.*, 1952, **16**, 1.
- [7] BAYLISS (M.), GLICK (D.) et SIEM (R. A.). *J. Bact.*, 1948, **55**, 307.
- [8] BELOZERSKY (A. N.). *Cold Spring Harbor Symp. on Quant Biol.*, 1947, **12**, 1.
- [9] BERGEY. *Manual of determinative bacteriology*, 6^e édit., Baillières, Paris, Tindall et Cox, Londres, 1948.
- [10] BOIVIN (A.), DELAUNAY (A.), VENDRELY (R.) et LEROULT (Y.). *Experimentia*, 1945, **1**, 334.
- [11] BOIVIN (A.), VENDRELY (R.) et VENDRELY (C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1061.
- [12] BURDON (K. L.). *J. Bact.* 1946, **52**, 665.
- [13] CALDWELL (P. C.) et HINSHELWOOD (C.). *J. Chem. Soc.*, Londres, 1950, **41**, 1415.
- [14] CHARGAFF (E.). In *The nucleic acids*, 1948, **1**, 307.
- [15] COHEN (S.) et ARBOGAST (R.). *J. exp. Med.*, 1950, **91**, 607.

- [16] CRAMPTON (C. F.), STEIN (W. H.) et MOORE (S.). *J. biol. Chem.*, 1957, **225**, 363.
- [17] DALY (M. M.), ALLFREY (V. G.) et MIRSKY (A. E.). *J. gen. Physiol.*, 1950, **33**, 497.
- [18] DIANZANI (M. U.). *Experientia*, 1950, **6**, 332.
- [19] DIANZANI (M. U.). *Boll. Ist. sieroterap. milan.*, 1950, **29**, 161.
- [20] DIANZANI (M. U.). *Exp. Cell Res.*, 1953 **5**, 311.
- [21] DIANZANI (M. U.) et MACCARI (A.). *Nuova Ann. Ig. Microbiol.*, 1950, **1**, 324.
- [22] DIENES (L.). *J. inf. Dis.*, 1939, **65**, 24.
- [23] DIENES (L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1939, **42**, 636.
- [24] DIENES (L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1940, **44**, 470.
- [25] DIENES (L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1941, **47**, 385.
- [26] DIENES (L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1947, **66**, 166.
- [27] DIENES (L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1948, **68**, 581.
- [28] DIENES (L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **75**, 412.
- [29] DIENES (L.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 274.
- [30] DREYER (G.), SCOTT (S. G.) et WALKER (E. W. A.). *J. Path. Bact.*, 1911, **16**, 146.
- [31] FLORKIN (M.). *L'évolution biochimique*, Masson, édit., Paris, 1944.
- [32] GRIFFITH (F.). *J. Hyg.*, 1928, **27**, 113.
- [33] HENRY (H.) et STACEY (M.). *Nature*, 1943, **151**, 671.
- [34] HOTCHKISS (R. D.). *Arch. Biochem.*, 1948, **16**, 131.
- [35] HOTCHKISS (R. D.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1954, **40**, 49.
- [36] HUGHES-SCHRADER (S.). *Biol. Bull.*, 1951, **100**, 178.
- [37] JARVI (O.) et LEVANTO (A.). *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 1950, **27**, 473.
- [38] KATSUNUMA (N.) et NAKASATO (H.). *Chem. Abstr.*, 1954, **48**, 5281.
- [39] KI YONG LEE, WAHL (R.) et BARBU (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 212.
- [40] KLIENEBERGER-NOBEL (E.). *J. gen. Microbiol.*, 1950, **4**.
- [41] KLIENEBERGER-NOBEL (E.). *J. Path. Bact.*, 1935, **40**, 93.
- [42] KLIENEBERGER-NOBEL (E.). *Zbl. Bakt.*, 1956, **165**, 329.
- [43] KNOBLOCH (A.), MATSUDAIRA (H.) et VENDRELY (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 2980.
- [44] KOSSEL (A.). *The protamines and histones*, Londres et New-York, 1928.
- [45] LARK (K. G.), MAALØE (O.) et ROSTOCK (O.). *J. gen. Microbiol.*, 1955, **43**, 318.
- [46] LARK (K. G.) et MAALØE (O.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, **21**, 448.
- [47] LAVILLAUREIX (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 1155.
- [48] LAVILLAUREIX (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **129**, 1155.
- [49] LEIDY (G.), HAHN (E.) et ALEXANDER (H. E.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 305.
- [50] MATTHEY (R.). *Experientia*, 1945, **1**, 50 et 78.
- [51] MANNIGER (R.) et NOGRADI (A.). *Experientia*, 1948, **4**, 276.
- [52] McMANUS (J. F. A.). *Nature*, 1946, **158**, 202.
- [53] MINCK (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **231**, 386.
- [54] MINCK (R.) et FRUHLING. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 2091.
- [55] MIRSKY (A. E.) et RIS (H.). *J. gen. Physiol.*, 1950, **34**, 451.

- [56] MORSE (M. L.) et CARTER (C. E.). *J. Bact.*, 1949, **58**, 317.
- [57] MOSES (M. J.) et YERGANIAN (G.). *Rec. Genet. Soc. Amer.*, 1952, **21**, 51.
- [58] MUDD (S.), BRODIE (A. F.), WINTERSCHIED (L. C.), HARTMAN (P. E.), BEUTNER (E. H.) et McLEAN (R. A.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 729.
- [59] OGUR (M.), MINCKLER (S.) et McCLARY (D. O.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 642.
- [60] PIERCE (G. H.). *J. Bact.*, 1942, **43**, 780.
- [61] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*, 3^e édit., Masson, Paris, 1957.
- [62] PRÉVOT (A.-R.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74**, 334.
- [63] REDDI (K. K.). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1954, **15**, 585.
- [64] RENDEL (J. M.) et KELLERMANN (G. M.). *Nature*, 1955, **176**, 829.
- [65] RIS (H.) et MIRSKY (A. E.). *J. gen. Physiol.*, 1949, **33**, 125.
- [66] SALTON (M. R. J.). *Biochim. et Biophys. Acta*, 1952, **9**, 334.
- [67] SCHAEFFER (P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 375.
- [68] SCHAEFFER (P.) et RITZ (E.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 1491.
- [69] SMITH (W. E.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 417.
- [70] SMITH (J. D.) et WYATT (G. R.). *Biochem J.*, 1951, **49**, 144.
- [71] STEMPEL (H.) et HUTCHINSON (W. G.). *J. Bact.*, 1951, **61**, 321.
- [72] SWIFT (H.) et RASCH (E.), cités par ALFERT (M.). *Intern. Rev. Cytol.*, 1954, **3**, 131.
- [73] TULASNE (R.). *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 223.
- [74] TALASNE (R.). *Biol. méd.*, 1955, **44**, 1.
- [75] TULASNE (R.) et LAVILLAUREIX (J.). *Schweiz. Z. allgem. Pathol.*, 1957 (sous presse).
- [76] TULASNE (R.) et VENDRELY (C.). *Schweiz. Z. allgem., Pathol.*, 1954, **47**, 49.
- [77] VENDRELY (C.). *Bull. Biol. France et Belg.*, 1952, **86**, 1.
- [78] VENDRELY (R.), KNOBLOCH (A.) et MATSUDAIRA (H.). *Nature*, 1957 (sous presse).
- [79] VENDRELY (R.) et TULASNE (R.). *Nature*, 1953, **171**, 262.
- [80] VENDRELY (R.) et VENDRELY (C.). *Experientia*, 1948, **4**, 434.
- [81] WEBB (M.). *J. gen. Microbiol.*, 1948, **2**, 260.
- [82] WEBB (M.). *Science*, 1953, **118**, 607.
- [83] WEIL (A. J.) et BINDER (M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1947, **66**, 349.
- [84] ZAMENHOF (S.). *Phosphorus Metabolism*, 1952, **2**, 301.
- [85] ZAMENHOF (S.). *Progress in biophys. biophys. Chem.*, 1956, **6**, 85.

Après l'impression de ce mémoire nous avons eu connaissance du travail de Belozersky (in *The origine of life on the Earth*, Moscou, 1957) confirmant la valeur taxonomique spécifique du rapport $\frac{G + T}{A + C}$ de l'ADN bactérien.

LA NOTION D'ESPÈCE

APRÈS LES RECHERCHES RÉCENTES

DE GÉNÉTIQUE BACTÉRIENNE

par Pierre SCHAEFFER.

*(Service de Physiologie microbienne,
Institut Pasteur, Paris)*

Alors que le nombre des combinaisons géniques possibles a été estimé par Wright [1] être de l'ordre de 10^{1000} , celui des espèces animales et végétales existantes est infime, relativement, puisqu'il n'est au total que de quelques millions (Dobzhanski [2]). L'immense majorité des combinaisons géniques qui ont dû se former au cours des âges ont donc été éliminées par la sélection naturelle, et seules ont subsisté celles, très rares, qui représentaient l'ajustement le meilleur aux différentes conditions de vie. En d'autres termes, seuls quelques « pics adaptatifs » (Dobzhanski [2]), c'est-à-dire quelques biotypes, ont subsisté, qui étaient les mieux adaptés aux niches écologiques existantes. Il en résulte que les biotypes actuels diffèrent les uns des autres de façon discontinue, et se prêtent donc à classification. Ces considérations sont également valables, que les organismes considérés se reproduisent de façon végétative ou sexuée.

Lorsqu'il s'agit, comme c'est le cas le plus souvent, d'organismes à reproduction biparentale, le maintien des biotypes exige qu'il ne se produise pas — ou pas habituellement — de croisements intertypes fertiles. Sinon, toutes les combinaisons géniques contre-sélectionnées au cours de l'évolution réapparaîtraient en quelques générations, formant un spectre continu de formes intermédiaires monstreuses.

Ayant ainsi, par l'évocation de visions d'apocalypse, reconnu la nécessité de l'isolement génétique pour la formation et le maintien des biotypes, nous voici préparés à accepter la définition génétique de l'espèce : une espèce est un groupe de populations naturelles, dont les individus peuvent se croiser entre eux,

mais non avec ceux d'autres populations semblables (1) (Mayr [3]). Grâce à cette définition, l'accord des systématiciens se réalise bien plus aisément pour reconnaître et délimiter une espèce, que lorsqu'il s'agit d'un genre, d'une famille, ou de toute autre catégorie systématique ; sa définition fait de l'espèce la catégorie fondamentale de la classification des organismes à reproduction biparentale. Cette catégorie, cependant, perd sa signification dans le cas des organismes à reproduction végétative ; la seule unité possible de classification est alors le clone, qui n'offre aucune facilité particulière de reconnaissance.

Les critères génétiques, indispensables à la définition de l'espèce, ont fait jusqu'à une date récente totalement défaut en bactériologie. Les systèmes de classification des bactéries ont donc dû se passer d'une définition de l'espèce bactérienne. Ils ne peuvent dès lors prétendre être que des instruments pratiques d'identification, permettant de grouper les bactéries d'après leurs caractères écologiques, morphologiques, biochimiques, sérologiques et pathogènes. L'identification est possible en général, car ces caractères sont généralement groupés de façon relativement stable. Cette manière de faire, justifiée empiriquement, l'est aussi pratiquement, puisque l'épidémiologiste, par exemple, se trouve aux prises avec des problèmes quotidiens, dont l'urgence ne permet pas d'attendre l'élaboration problématique d'une classification biologique des bactéries. Aucune confusion n'aurait pu se faire jour, si les auteurs des clés dichotomiques d'identification avaient parlé de groupes et de sous-groupes bactériens, en évitant de prononcer le nom d'espèce, dont ils ne pouvaient justifier l'emploi.

Depuis quelques années des phénomènes de transfert de matériel génétique de bactérie à bactérie ont été découverts. Étudiés d'abord entre individus porteurs du même nom, ils ont récemment été décelés entre individus porteurs de noms différents. Loin de remettre en question l'existence de groupes taxonomiques chez les bactéries, cette découverte met simplement et crûment en lumière ce qui n'aurait jamais dû cesser d'être l'évidence, à savoir : que les « espèces » des bactériologistes, si elles sont des unités valables de classification, ne sont pas des espèces au sens biologique du mot. Lorsque l'on constate que, comme nous le verrons, *Escherichia coli* peut se croiser avec *Shigella dysenteriae*, et donner naissance à une descendance dans laquelle les caractères parentaux sont recombines, la signification la plus immédiate du phénomène est que les deux organismes progéni-

(1) Cette définition confond sciemment, dans un but de simplification, l'espèce et le syngaméon. Le lecteur qui ne se satisferait pas de cette simplification est renvoyé au livre de Dobzhanski déjà cité.

teurs appartiennent à une seule et même espèce, au sens biologique du terme, dont ils représentent des sous-espèces, types, races ou variétés distincts.

Mais la nomenclature bactérienne est ce qu'elle est ; si elle doit un jour changer, ce ne sera que sur décision de commissions internationales habilitées à cet effet. En attendant, *E. coli* et *Sh. dysenteriae* sont des « espèces bactériennes » et force est donc, malgré le paradoxe, de qualifier un tel croisement d'interspécifique. C'est du moins l'attitude adoptée dans cet article, qui se propose de passer en revue les cas de transfert génétique « interspécifique » connus à ce jour chez les bactéries. Ces transferts peuvent s'effectuer par transduction, transformation ou conjugaison, mécanismes dont nous commencerons par rappeler brièvement les caractéristiques.

RAPPEL DES CARACTÉRISTIQUES ESSENTIELLES

DES TROIS MÉCANISMES DE TRANSFERT GÉNÉTIQUE CHEZ LES BACTÉRIES.

I. CONJUGAISON. — Découverte par Lederberg et Tatum chez certaines souches d'*E. coli*, la conjugaison requiert le contact entre individus bactériens [4]. Pour que ce contact conduise à conjugaison, encore faut-il que les protagonistes aient des « polarités F » (ou sexes) différentes [4, 5]. Le sexe dit F⁻ se définit par le fait que deux individus de ce sexe ne se conjuguent pas. Le sexe F⁺ est fertile surtout dans ses conjugaisons avec F⁻, mais même alors la fréquence de recombinaison est très faible (10⁻⁶). La raison de cette basse fréquence tient au fait que seuls de rares mutants, dits Hfr, sont capables, dans une population F⁺, de donner des recombinants par conjugaison avec des bactéries F⁻ [6]. Isolées, ces souches Hfr ont, elles, une haute fréquence (Hfr) de recombinaison avec les bactéries F⁻ [7, 5]. Une autre particularité surprenante du système de polarité sexuelle de *E. coli* tient dans le fait que des bactéries F⁻ acquièrent le caractère F⁺ par contact avec des bactéries F⁺ [4, 5].

Le mécanisme d'un croisement Hfr × F⁻ consiste en l'injection ou transfert d'un chromosome du parent Hfr dans le parent F⁻, qui devient donc un zygote. Mais ce transfert est le plus souvent incomplet, un fragment seulement du chromosome Hfr étant injecté ; le zygote formé n'est donc diploïde que pour les gènes injectés (mérozygote [8]). Il en résulte que les bactéries recombinantes auront en majorité les caractères de leur parent F⁻ [5]. Le parent Hfr joue dans le croisement le rôle actif de *donneur* de certains de ses gènes, le parent F⁻ le rôle passif de *récepteur*.

II. TRANSDUCTION. — Découvert par Zinder et Lederberg chez *Salmonella typhimurium*, ce phénomène ne nécessite pas le

contact des protagonistes bactériens [9, 10]. Ici encore une bactérie joue le rôle de donneur de matériel génétique, l'autre celui de récepteur. Mais le matériel transféré l'est par l'intermédiaire d'un bactériophage.

Le génôme de la bactérie donatrice se trouve dans un premier temps fragmenté et distribué parmi les phages qui sont libérés lors de la lyse ; lorsqu'un phage ainsi produit s'adsorbe, dans un second temps, sur une bactérie réceptrice, le fragment de génôme bactérien qu'il contient est injecté en même temps que son propre matériel génétique. Parmi les bactéries infectées, les survivantes sont l'équivalent formel de mérozygotes et dans leur descendance apparaîtront des bactéries recombinantes tenant certains de leurs caractères (un très petit nombre) de leur parent donneur et la grande majorité de leur parent récepteur.

La nécessité d'une polarité sexuelle a disparu, elle est remplacée par celle du phage-vecteur.

III. TRANSFORMATION. — Découvert par Griffith chez *Diplococcus pneumoniae*, ce phénomène est aujourd'hui connu chez des *Hemophilus*, *Neisseria meningitidis*, certains *Streptococcus*, etc. Il requiert lui aussi la lyse du parent donneur, qui peut être effectuée par des agents divers (détergents, pénicilline, etc.). Le matériel génétique est libéré en solution, donc sous une forme sensible à la désoxyribonucléase (Avery et coll. [11]). C'est à la bactérie réceptrice elle-même de le prendre dans le milieu, ce qu'elle ne peut apparemment faire que lorsqu'elle se trouve dans un état physiologique particulier dénommé l'état de compétence. Ici encore, la bactérie recombinante héritera la grande majorité de ses caractères de la bactérie réceptrice, et un très petit nombre seulement de son parent donneur.

IV. CONVERSION. — Il ne s'agit plus ici d'une recombinaison entre deux génômes bactériens, mais de l'apparition de nouveaux caractères bactériens héréditaires, sous l'influence de la lysogénisation d'une bactérie par un bactériophage. La lysogénisation consiste en l'intégration du chromosome bactérien et du matériel génétique du phage ; ce matériel, une fois intégré, est appelé prophage [12]. Le prophage est reproduit à chaque division, comme le reste du génôme bactérien. Sa présence dans le génôme se traduit par l'acquisition de propriétés nouvelles, dont la plus frappante est peut-être l'immunité de la bactérie lysogène au phage qu'elle héberge sous forme de prophage ; mais elle peut aussi affecter (« convertir ») divers caractères bactériens de façon héréditaire. A la différence de la transduction, dans laquelle le phage ne joue qu'un rôle épisodique de vecteur, la conversion est liée à la lysogénisation (bibliographie dans Hartman [13]).

LES RECOMBINAISONS INTERSPÉCIFIQUES DE CARACTÈRES
CHEZ LES BACTÉRIES.

I. RECOMBINAISON PAR TRANSDUCTION DANS LE GENRE *Salmonella*. — L'analyse sérologique des *Salmonella* a montré l'existence d'antigènes somatiques et flagellaires, dont certains sont communs à plusieurs types bactériens ; chaque type est caractérisé, dans la classification en usage de Kauffmann-White, par une certaine combinaison de ces antigènes. Les « espèces » dans le genre *Salmonella* ont déjà perdu beaucoup de leur importance pratique au profit des sérotypes.

Or il est possible, par transduction, de modifier la formule antigénique flagellaire d'une *Salmonella* (Zinder et Lederberg [9]). Le nombre déjà grand des combinaisons naturelles d'antigènes peut, par ce moyen, être encore augmenté, des sérotypes nouveaux étant créés par transduction (Lederberg et Edwards [14]). Il semble, cependant, que seuls les antigènes flagellaires puissent être transduits. Si la souche réceptrice est monophasique, son antigène flagellaire unique peut être remplacé par l'antigène de phase 1 de la souche donatrice. Par exemple, sous l'action d'un certain phage transducteur, produit par *S. typhimurium* (IV V XII.i:1,2), une souche de *S. typhi* (IX XII d:—) produit des recombinants de formule antigénique IX XII, i:—, la souche transduite restant monophasique.

Si l'on prend pour récepteur une culture en mélange de phases d'une souche diphasique, l'antigène flagellaire remplacé, dans les recombinants produits sous l'action d'un phage transducteur, peut être, soit l'antigène de phase 1, soit l'antigène de phase 2. Par exemple, avec *S. typhimurium* en mélange de phases comme donneur et *S. miami* (IX XII a:1,5) en mélange de phases comme récepteur, des souches recombinantes sont formées, de formules antigéniques IX XII i:1,5 et IX XII a:1,2. Il est d'ailleurs possible de remplacer les antigènes flagellaires des deux phases, mais au prix de deux transductions successives. Dans l'exemple ci-dessus, la souche recombinante IX XII i:1,2 pourrait s'obtenir en retraitant par le même phage l'un quelconque des recombinants obtenus dans la première expérience de transduction. Tout se passe comme s'il y avait remplacement complet d'un antigène par un autre au cours de la transduction. Les caractères transduits sont aussi stables dans la souche recombinante qu'ils l'étaient dans le donneur, et bien que des antigènes tels que 1,5, 1,2, *enx*, etc. soient des mosaïques, ils ont été transmis par transduction comme des unités.

La transduction exige l'adsorption du phage sur la bactérie réceptrice ; dans les exemples ci-dessus, cette adsorption requé-

rait la présence de l'antigène somatique XII, de sorte que seules pouvaient être transduites les souches appartenant aux groupes somatiques A, B et D, possesseurs de cet antigène. Pour transduire des souches appartenant à d'autres groupes, le choix d'un autre phage s'impose. Les phages Vi, par exemple, sont également transducteurs. Ils ont été utilisés par Baron pour transduire des caractères fermentaires, nutritionnels, ou de résistance à un antibiotique de *S. typhi* à *S. paratyphi* C et à *S. ballerup* [15]. Mais ce sont les transductions de caractères antigéniques qui ont de beaucoup été les plus étudiées ; comme ces caractères se prêtent mal aux études quantitatives, les fréquences de ces transductions ne semblent pas avoir retenu beaucoup l'attention.

Appendice. — Conversion des caractères antigéniques somatiques des Salmonella. — Après lysogénisation par certains phages, des souches de *Salmonella* se mettent à produire des antigènes somatiques qu'elles ne produisaient pas auparavant. Iseki et Sakai, qui ont découvert ce phénomène, l'ont observé sur une souche de formule antigénique III X, qui devient III XV après lysogénisation. Le phage lysogénisant n'a pas besoin de provenir d'une bactérie possédant l'antigène XV pour que le phénomène se produise, ce qui contribue à montrer qu'il ne s'agit pas d'une transduction. Le même phage agissant sur une souche de constitution antigénique I III XIX conduit à des bactéries lysogènes de constitution I III XV XIX. Un autre antigène somatique, l'antigène I, est acquis après lysogénisation par un autre bactériophage. La nature du phénomène ressort aussi de l'étude des effets des antisérums. Une souche produisant l'antigène XV, cultivée en présence d'un sérum anti-XV, se met à produire l'antigène X, au lieu de XV. Le mécanisme de cette apparente conversion par un anticorps est le suivant : l'antisérum, préparé par injection à l'animal de bactéries lysogènes, contient aussi des anticorps antiphage ; ajouté à une culture de bactéries (lysogènes) produisant l'antigène XV, il neutralise le phage libre, empêche la réinfection, agglutine les bactéries et permet ainsi la sélection des rares individus bactériens ayant perdu leur prophage et avec lui leur antigène XV. Il s'agit donc du même phénomène de conversion, mais observé en sens inverse (bibliographie dans Hartman [13]).

II. RECOMBINAISON PAR TRANSFORMATION DANS LE GENRE *Hemophilus*. — Les études, dans ce cas, n'ont porté que sur un seul caractère (la résistance à la streptomycine), l'analyse portant principalement sur la fréquence du phénomène en fonction de l'espèce de la souche donatrice (Schaeffer [16], Leidy et coll. [17]).

Une même culture compétente d'une souche transformable

d'*H. influenzae* est transformée avec des fréquences respectivement égales à 4×10^{-3} , 1×10^{-5} et 4×10^{-7} , selon que le donneur est un mutant résistant de *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* ou *H. suis*. La possibilité des transformations interspécifiques démontre l'existence d'une homologie génétique, au moins au voisinage du locus « streptomycine », chez les trois espèces utilisées. Cette homologie se retrouve lorsque le récepteur est *H. parainfluenzae* [47]; dans tous les cas, c'est toujours la transformation intraspécifique qui a la fréquence la plus élevée.

Le nombre des caractères ainsi transférables d'une espèce à l'autre, c'est-à-dire l'étendue de l'homologie génétique, n'est pas connu. Des essais de transfert, de *H. parainfluenzae* à *H. influenzae*, de la faculté de synthétiser l'hématine (qui, réussis, auraient signifié une « transspéciation », d'après la classification actuelle), sont restés infructueux. La cause de cet insuccès pourrait se trouver dans une délétion chromosomique de *H. influenzae*, incluant le locus streptomycine, ou dans un contrôle polygénique de la synthèse de l'hématine. L'une et l'autre de ces causes possibles seraient en accord avec l'absence constatée de mutation de *H. influenzae* vers une forme synthétisant l'hématine.

La fixation d'acide nucléique par la culture réceptrice d'*H. influenzae* est la même, que celui-ci provienne d'*H. influenzae*, d'*H. parainfluenzae* ou de *H. suis*, ainsi que l'ont montré des expériences utilisant des acides nucléiques marqués au phosphore radioactif [48]. Des fixations inégales ne peuvent donc être invoquées pour expliquer l'énorme variation de la fréquence de transformation avec la nature de la souche donatrice. Il faut donc rechercher la raison de cette variation, soit dans les difficultés d'appariement entre l'ADN hétéro-spécifique et la structure chromosomique de la bactérie réceptrice, soit dans une viabilité moindre des bactéries issues de transformations interspécifiques [49]. Quelle que soit d'ailleurs la raison, si nous appelons i le rapport du nombre des bactéries transformées dans une réaction interspécifique, au nombre correspondant obtenu dans la réaction intraspécifique, les résultats suggèrent que la valeur de i pourrait être interprétée comme mesurant la parenté entre les deux espèces [46, 47]. La validité de cette interprétation serait cependant mise en question par les résultats de MacLeod mentionnés ci-dessous.

III. RECOMBINAISON PAR TRANSFORMATION ENTRE *Streptococceae*.

— La résistance à la streptomycine de *Diplococcus pneumoniae* peut être conférée à certaines souches de *Streptococcus viridans*, ou de *S. salivarius* par transformation (Bracco et coll. [20]). Dans ce cas également, les transformations réciproques s'observent. Mais, pour MacLeod et ses collaborateurs, les fréquences de trans-

formation dépendraient de trop de variables incontrôlées pour pouvoir servir de base au calcul d'un indice de parenté entre espèces.

La résistance spontanée des souches de *Streptococcus* à l'optochine contraste avec la sensibilité de *D. pneumoniae* ; elle s'observe si régulièrement, qu'on a proposé de l'utiliser comme un critère de diagnostic entre ces deux groupes de bactéries ; elle peut cependant être transmise au pneumocoque par transformation [20].

IV. RECOMBINAISON PAR TRANSDUCTION ET PAR CONJUGAISON ENTRE *Enterobacteriaceae*. — Des recombinaisons génétiques sont possibles entre *Escherichia coli* et diverses espèces de *Shigella* : *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri* et *Sh. boydii* [Lennox [21], Luria et Burrous [22] (2)]. Etant donné l'importance que revêt dans la classification des *Enterobacteriaceae* le caractère de fermentation du lactose, le résultat le plus frappant est la possibilité de conférer à *Sh. dysenteriae*, par exemple, un caractère Lac⁺ (faculté d'acidifier le milieu aux dépens du lactose), qu'on ne l'a jamais vu acquérir par mutation. Le transfert aux *Shigella* du caractère Lac⁺ de *E. coli* peut cependant s'obtenir, par transduction et par conjugaison ; une β -galactosidase active a été extraite des *Shigella* transduits. Les hybrides Lac⁺ acidifient le milieu (pH 4,9) à partir du lactose en moins de vingt-quatre heures, mais sans formation de gaz.

Nombreux sont les caractères que les *Shigella* peuvent acquérir par conjugaison avec *E. coli* ; c'est ainsi que des souches Lac⁺ et Xyl⁺, ou Rham⁺, de *Sh. dysenteriae*, Lac⁺ et Ara⁺ de *Sh. flexneri*, toutes stables, ont pu être obtenues, bien qu'elles constituent officiellement des monstruosités. La multiplicité des caractères transmissibles de *E. coli* aux *Shigella* démontre l'étendue des homologues génétiques existant entre ces deux groupes bactériens. Les cartes chromosomiques qui commencent à s'élaborer montrent la similitude de certains segments chromosomiques dans les deux groupes. Parmi les similitudes, il faut aussi signaler le fait que les *Shigella* partagent avec *E. coli* le même système de polarité sexuelle : toutes les souches de *Shigella* étudiées sont F⁻ ; il en résulte : 1° qu'elles ne sont fertiles, dans les croisements avec *E. coli*, que si l'on emploie des souches F⁺ ou Hfr de ce dernier ; 2° que les recombinants obtenus ont encore en majorité les caractères de leur parent *Shigella* (on présume qu'ils en ont le pouvoir pathogène, mais ce point n'a pas été vérifié).

Quant aux dissemblances entre les deux groupes bactériens,

(2) Luria dit aussi avoir essayé des croisements entre *E. coli* et des *Salmonella*, et entre *E. coli* et *Pasteurella pestis*, mais sans succès.

qu'il faut bien attendre aussi, elles se traduisent par les deux observations suivantes : 1° la fréquence de recombinaison de *E. coli* F+ (ou Hfr) avec un *Shigella* est cent à mille fois plus faible qu'avec *E. coli* F-, et ceci en dépit du fait que la fréquence de conjugaison est la même dans les deux croisements ; 2° tous les caractères du parent *E. coli* ne passent pas dans les bactéries recombinantes : la motilité et la faculté de fermenter le mannitol, de produire de l'indole ou de produire des gaz au cours des fermentations, ne sont jamais transmises.

★ ★

La confrontation des résultats exposés avec une clé dichotomique pour diagnostic bactériologique, comme celle de Bergey [23], nous amènerait aux constatations suivantes : La transduction intertypes chez les *Salmonella* et la transformation chez *Hemophilus* représentent des cas de recombinaison interspécifique à l'intérieur d'un même genre ; la transformation entre *Streptococceae* représente des recombinaisons intergénériques à l'intérieur d'une même tribu ; les conjugaisons et les transductions observées chez les *Enterobacteriaceae* sont des recombinaisons intertribales à l'intérieur d'une même famille.

Plutôt que d'adopter cette conclusion, il semble plus juste de conclure à l'imperfection des classifications en usage.

DISCUSSION.

Récemment introduite en bactériologie, la génétique peut, en mettant en évidence des homologies chromosomiques, participer utilement à l'élaboration d'une systématique rationnelle. Elle a déjà, nous venons de le voir, mis en relief des erreurs de nomenclature ; mais il convient cependant de remarquer que ce sont entre des groupes bactériens dont les classifications existantes soulignaient déjà la parenté, que des recombinaisons intergroupes sont observées. Il fallait s'y attendre, puisque les classifications sont basées sur des analogies phénotypiques, qui ne font le plus souvent qu'exprimer les analogies génétiques. Il est cependant remarquable que les systématiciens en soient récemment arrivés, en dehors de toute considération génétique, à bannir les termes d'espèce, de genre, etc., comme étant d'un emploi non justifié et que, sur la seule étude des phénotypes, des auteurs aient pu suggérer par exemple la fusion des groupes *Shigella* et *Escherichia* (Cf. Thibault [24]).

Les quelques résultats rassemblés dans cet article suggèrent déjà que la nomenclature bactérienne a prodigué des dénominations d'espèces, là où seuls existaient des races ou types diffé-

rents ; il est à prévoir que les progrès de la génétique ne laisseront subsister qu'un nombre restreint d'espèces polytypiques, isolées au point de vue génétique.

A propos de l'isolement génétique, il convient de remarquer que les phénomènes de transduction et de transformation, lorsqu'ils ne sont établis que pour un petit nombre de caractères, révèlent des homologies génétiques qui peuvent n'être que très limitées. Ils ne peuvent donc avoir une signification comparable à celle de la compatibilité reproductive des organismes supérieurs, qui suppose une analogie s'étendant au nombre et à l'architecture des chromosomes. Alors que, même chez les organismes supérieurs, des hybrides d'espèces sont parfois possibles, ce serait sans doute commettre une erreur grossière que d'interpréter l'existence d'une transduction ou d'une transformation entre deux groupes bactériens, comme une preuve suffisante d'appartenance à la même espèce. Quant à l'absence constatée de conjugaison ou de transformation entre deux groupes, elle est moins décisive encore, puisqu'elle peut être due à des systèmes de polarité non reconnus, et puisque même au sein des espèces transformables, nombreuses sont les souches qui ne le sont pas.

La possibilité d'hybridation entre deux groupes bactériens pourrait, comme l'ont fait remarquer Lederberg [14] et Luria [22], ne pas créer dans la nature un flux de gènes bien important entre ces groupes, puisque la multiplication des bactéries par voie végétative est indéfiniment possible et puisque les transferts génétiques inter-groupes, même lorsqu'on les provoque au laboratoire dans les conditions optimales, sont des événements rares. Des populations bactériennes peuvent donc, sous l'influence des mutations, d'occasionnelles recombinaisons et de la sélection naturelle, évoluer dans des sens divergents, sans que cette divergence évolutive soit freinée par un important flux de gènes ; ainsi s'expliquerait la polytypie considérable des espèces bactériennes.

★★

Nous remercions vivement le Dr S. E. Luria de nous avoir communiqué son manuscrit avant publication.

RÉSUMÉ.

Des recombinaisons génétiques sont possibles, par transduction, transformation ou conjugaison, entre divers sérotypes de *Salmonella*, entre diverses « espèces » d'*Hemophilus*, entre *D. pneumoniae* et certains *Streptococcus*, enfin entre *E. coli* et divers *Shigella*. Leur existence révèle des homologies génétiques entre

groupes bactériens, dont on sait, dans le dernier cas cité au moins, qu'elles intéressent d'assez longs segments de chromosome. Il conviendra sans doute, lorsque les données génétiques seront plus nombreuses, que la systématique et la nomenclature bactériennes soient modifiées pour tenir compte de ces homologies. L'espèce bactérienne, en acquérant une définition génétique, finira peut être par être autre chose qu'une alliance de mots.

SUMMARY

GENETICS AND THE BACTERIAL SPECIES.

Genetic recombination has been observed to occur between serotypes within the genus *Salmonella*, between « species » within the genus *Hemophilus*, between *D. pneumoniae* and some groups of *Streptococcus*, and between *E. coli* and several representatives of the genus *Shigella*. Genetic homologies, shown in one case to extend over a whole segment of the linkage group, exist therefore between various groups of bacteria. The growing body of genetic data will probably, in time, make it necessary for bacterial taxonomy and nomenclature to take these homologies into account. The bacterial species, an arbitrary taxonomic category for a long time, might at last acquire some biological meaning.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WRIGHT (S.). Cité in Dobzhanski [2].
- [2] DOBZHANSKI (T.). *Genetics and the Origine of Species*. 2^e édit., 1947. Columbia Univ. Press, New York.
- [3] MAYR (E.). *Adv. in Genetics*, 1948, **2**, 205.
- [4] LEDERBERG (J.) et TATUM (E. L.). *Science*, 1953, **118**, 169.
- [5] HAYES (W.). *J. Gen. Microbiol.*, 1953, **8**, 72.
- [6] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 303.
- [7] CAVALLI (L. L.). *Boll. Ist. sieroterap. milan.*, 1950, **29**, 1.
- [8] WOLLMAN (E. L.) et JACOB (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2449.
- [9] ZINDER (N. D.) et LEDERBERG (J.). *J. Bact.*, 1952, **64**, 679.
- [10] ZINDER (N. D.). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 261.
- [11] AVERY (O. T.), MACLEOD (G. M.) et MCCARTY (M.). *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 137.
- [12] LWOFF (A.) et GUTMANN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78**, 711.
- [13] HARTMAN (P. E.). *The Chemical Basis of Heredity*. The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 408.
- [14] LEDERBERG (J.) et EDWARDS (P. R.). *J. Immunol.*, 1953, **71**, 232.
- [15] BARON (L. S.). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 271.
- [16] SCHAEFFER (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 192.

- [17] LEIDY (G.), HAHN (E.) et ALEXANDER (H. E.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 305.
 - [18] SCHAEFFER (P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 375.
 - [19] SCHAEFFER (P.). In : *Biological replication of macromolecules*, 1957, Symp. Soc. Exp. Biol., London.
 - [20] BRACCO (R. M.), KRAUSS (M. R.), ROE (A. S.) et MacLEOD (C. M.). *J. exp. Med.*, 1957, **106**, 247.
 - [21] LENNOX (E. S.). *Virology*, 1955, **1**, 190.
 - [22] LURIA (S. E.) et BURROUS (J. W.). *J. Bact.*, 1957 (*sous presse*).
 - [23] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams et Wilkins Co., Baltimore.
 - [24] THIBAUT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 213.
-

LA NOTION D'ESPÈCE DANS LE GENRE *BRUCELLA*

par Gérard RENOUX.

(*Institut Pasteur de Tunis*)

On sait que, s'agissant des êtres vivants supérieurs, les savants spécialisés ont souvent de grandes difficultés à déterminer s'il convient de considérer que tel ou tel échantillon appartient à une espèce nouvelle ou est une variété d'une espèce déjà connue. En effet, la définition la plus généralement acceptée d'une espèce botanique est la suivante : « L'unité de classification est un groupe cohérent d'individus similaires, qu'on appelle espèce. Ce terme est difficile à définir avec précision car une espèce n'est pas une entité définie, mais seulement un concept taxonomique » (Hitchcock, 1925).

L'espèce bactériologique est, en soi, une notion encore plus vague. Comment pourrait-il en être autrement puisque les microbiologistes ne disposent pas encore des critères qui permettent aux botanistes et aux zoologistes d'étayer les descriptions d'une espèce animale ou végétale ?

En microbiologie, nous n'avons pas ces critères morphologiques, sexuels, et de biotope qui sont la base des définitions botaniques et zoologiques. En l'état actuel de la question, nous sommes bien obligés de nous contenter de caractères différentiels surtout d'ordre nutritionnel. Nous décidons donc qu'une bactérie donnée est d'une « espèce » différente d'une autre bactérie, morphologiquement semblable, parce que la première utilise, par exemple, le lactose, tandis que la seconde ne l'utilise pas. Ceci résulte, évidemment, d'un consentement mutuel, sur lequel nous reviendrons, mais ne peut en aucun cas être considéré comme la base d'une classification fondamentalement scientifique. Transposée à l'échelle zoologique, une telle attitude reviendrait à dire qu'un Chinois qui se nourrit de poisson et de riz n'appartient pas à la même espèce animale qu'un Européen qui se nourrit de pain et de bœuf.

De la même façon, nous pourrions imaginer un Martien, détenteur d'une classification basée sur nos concepts microbiologiques, revenant chez lui après un voyage sur la terre et déclarant à l'Académie des Sciences de Mars avoir observé dans ses voyages de curieux exemples de parasitisme : « Il s'agit d'un être petit,

assez ressemblant à l'animal parasité, qui suce avec une satisfaction évidente une sécrétion blanche qu'il obtient par excitation de certaines parties du corps de l'animal parasité. Cependant, l'animal parasité paraît très heureux de cette spoliation qui lui est imposée et se nourrit de divers aliments solides, aux couleurs variées. Un tel parasitisme s'observe très fréquemment sur la terre, chez un grand nombre d'animaux morphologiquement très différents les uns des autres. Je puis dire qu'un tel parasitisme est propre aux animaux terriens. Je propose la réunion d'une commission de classification pour dénommer parasites et hôtes » — suivait alors la projection d'un grand nombre de clichés où les Terriens n'auraient eu aucune peine à reconnaître une femme, une vache, une chienne, etc. allaitant leur enfant.

Nous devons être très conscients du fait que les classifications des microbes en espèces et en variétés sont indispensables pour la médecine, l'art vétérinaire, l'agriculture ou l'industrie, mais que ces classifications n'ont pas les mêmes bases scientifiques que la classification des autres êtres vivants.

En l'état actuel de nos connaissances, force est de s'en contenter.

Je l'ai déjà dit, cette classification repose sur un consentement mutuel. Le fait que j'affirme que tel microbe, avec telles ou telles caractéristiques, constitue une « espèce » bactérienne, alors que M. X. pense qu'il ne s'agit que d'une variété, ne prouve pas que l'un de nous aie tort. Selon le mot de Cowan, la notion d'espèce en bactériologie est un caractère aussi subjectif que la migraine. Quand je dis que j'ai mal à la tête, nul ne peut affirmer que j'ai tort ou raison.

Pour un grand nombre de microbes, ce consentement mutuel de tous les microbiologistes existe et permet à chacun de parler le même langage.

La définition d'une espèce bactériologique repose, d'après les Recommandations du I^{er} Congrès International de Microbiologie de 1930 et du V^e Congrès Botanique International de la même année, sur un certain nombre de bases dont nous voulons rappeler l'essentiel :

1^o Chaque sorte de bactérie distincte d'une autre est une espèce ;

2^o Les caractères applicables à la différenciation des espèces doivent montrer une certaine constance quand ils sont étudiés dans une large série. De plus, ces caractères doivent montrer une corrélation avec d'autres caractéristiques constantes.

A quoi l'on peut ajouter valablement les deux règles suivantes :

1^o Aucune classification des espèces ne peut être basée sur le choix d'une seule caractéristique ;

2^o Aucune classification microbiologique ne saurait reposer sur

le choix de caractéristiques sujettes à mutation simple (Luria, 1947).

Ce sera sur ces bases que nous discuterons de la notion d'espèce dans le genre *Brucella*, n'hésitant pas à des répétitions si elles nous paraissent utiles à la clarté de l'exposé. Cet exposé ne tiendra aucun compte de *Br. tularensis* ni de *Br. bronchisepticus*, dont la position systématique reste sujette à discussion. Nous nous en tiendrons aux *Brucella*, *sensu stricto*, agents des brucelloses humaines ou animales.

Il nous paraît utile, pour étayer notre opinion, de passer en revue l'essentiel de nos connaissances sur les *Brucella*.

Disons-le tout de suite, l'importance économique de la brucellose a orienté les recherches surtout vers les applications pratiques, au détriment des connaissances fondamentales. Peu de bactéries découvertes depuis soixante-dix ans, comme les *Brucella*, sont encore aussi mal connues des microbiologistes.

On le sait, c'est à Bruce, en 1887, que l'on doit l'isolement à Malte de l'agent responsable de la fièvre méditerranéenne de l'homme et de la chèvre. Dix ans plus tard, Bang décrit au Danemark le bacille de l'avortement épizootique de la vache, et en 1914 Traum découvre aux Etats-Unis, dans des fœtus de porc, le microbe de l'avortement des truies.

L'éloignement géographique des découvertes, les espèces animales hôtes, les descriptions morphologiques des microbes, tout contribuait à faire de ces bactéries des espèces différentes. On doit à Alice Evans la démonstration, en 1918, de l'identité profonde de ces différentes espèces. Cette unité des *Brucella* fut difficilement admise et il fallut attendre la confirmation qu'en donnèrent Meyer et Shaw en 1920 et Et. Burnet en 1923.

Meyer et Shaw créèrent le genre *Brucella*.

Ces auteurs concluent : « l'organisme, agent de la fièvre ondulante de l'homme et de la fièvre de Malte des chèvres, ne peut être distingué ni morphologiquement, ni biochimiquement de l'organisme responsable de l'avortement infectieux des animaux domestiques ».

Cependant, étant donnée l'importance pratique — au moins apparente — d'une différenciation intraspécifique des *Brucella* (*Br. melitensis* infecte seulement les chèvres et l'homme, *Br. abortus* infecte seulement les vaches et l'homme, etc. selon les idées couramment admises à l'époque), d'innombrables techniques furent proposées pour séparer, à l'intérieur du genre *Brucella*, les diverses espèces.

Grâce à Huddleson (1921, 1929) nous disposons de techniques simples qui font appel au besoin en gaz carbonique, à l'action bactériostatique de certains colorants et au dosage semi-quantitatif.

tatif de l'hydrogène sulfuré dégagé. Ces techniques permettent l'identification de la plupart des souches de *Brucella* et leur classification en trois « espèces » et une variété : *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*, avec sa variété danoise, selon le schéma suivant (tableau I).

TABLEAU I.

	Besoin en CO ₂	Culture en présence		Dégagement de SH ₂
		Thionine	Fuchsine	
<i>Br. melitensis</i>	-	+	+	-
<i>Br. abortus</i>	+	-	+	+ ou ++
<i>Br. suis</i>	-	+	-	+++
var. danoise	-	+	-	-

Ces méthodes d'identification des *Brucella* et de classification en espèces ne tiennent pas compte du contenu antigénique des *Brucella*. Cependant, dès 1920, Feusier et Meyer avaient établi qu'il était possible de séparer en quatre groupes les *Brucella*, selon les résultats des absorptions de sérums spécifiques.

De nombreux auteurs se sont appliqués à cette étude, avec des résultats si variables qu'il ne nous paraît pas indispensable de les rapporter ici. Ces variations paraissent dues aux difficultés qui existaient alors pour distinguer les phases lisses ou rugueuses des *Brucella*.

Mais Wilson et Miles (1932) établissent, en utilisant uniquement des souches lisses, soigneusement sélectionnées, qu'il est possible de préparer des sérums monospécifiques adsorbés utilisables pour l'identification des souches de *Brucella*. On dispose, depuis ces auteurs, de deux sérums : anti-M et anti-A. *Brucella abortus* et *Brucella suis* sont, l'un et l'autre, agglutinés par le sérum anti-A, *Brucella melitensis* est agglutiné par le sérum anti-M.

Nous pouvons confirmer que ces sérums monospécifiques adsorbés sont, certainement, parmi les plus faciles à préparer. Il suffit de disposer de deux souches, l'une sûrement *Br. abortus*, l'autre sûrement *Br. melitensis* et que ces deux souches soient en phase lisse.

Cependant force est de constater que l'emploi de tels sérums est encore limité. A notre connaissance, peu de publications en mentionnent l'utilisation. Cet état de fait, croyons-nous, correspond à une certaine forme de « confort intellectuel ». L'étude des antigènes des *Brucella*, s'ajoutant à l'identification « huddle-

sonienne », aboutit fatalement à reconnaître l'existence d'autres espèces (1), en plus des trois espèces classiques de *Brucella* ; tous les esprits ne sont pas préparés à admettre cette évidence.

Parmi ces « espèces » nouvelles, la mieux étudiée est *Br. intermedia* (Renoux, 1952 *b*) qui possède les caractères biochimiques de *Br. melitensis* mais n'est agglutinée que par le sérum anti-A.

Cette espèce, *Br. intermedia*, est largement répandue dans le monde : Afrique Equatoriale Française, Allemagne, Argentine, Autriche, Belgique, Congo belge, Espagne, Etats-Unis d'Amérique, France, Grande-Bretagne, Grèce, Inde, Israël, Italie, Kenya, Pologne, Portugal, Rhodésie, Suisse, Sumatra, Tchécoslovaquie, Tunisie, Turquie, URSS (Bevan, 1930 ; Zdrodowski et coll., 1930 ; Veazie et Meyer, 1936 ; Schaff et Rosa, 1940 ; Polding, 1950 ; Vandepitte et Wiktor, 1951 ; Huddleson, 1952 ; Renoux, 1952 *b* ; Stableforth, 1952 ; Levi et coll., 1952 ; Gargani et Donnini, 1953 et 1954 ; Cruickshank, 1954 ; Burgisser, 1955 ; Renoux et coll., 1955 ; Carrère et coll., 1957 ; Niznansky, 1957 ; Gargani, Benelli et Guerra, 1957). Il existe d'autres types, assez répandus, ayant par exemple les caractères biochimiques de *Br. abortus* et les caractères sérologiques de *Br. melitensis*.

La méconnaissance, volontaire ou non, de l'existence de telles « espèces » aboutit soit à considérer que l'identification sérologique des *Brucella* est sans valeur, soit à dénommer arbitrairement de telles souches. De ce fait, les uns n'utiliseront jamais les épreuves sérologiques pour classer leurs souches de *Brucella* et nieront, *ipso facto*, l'existence de « types » nouveaux ; les autres, selon l'humeur du moment ou l'étiquette que porte le tube à son arrivée au laboratoire, classeront les souches « thionine et fuchsine +, sérologie *abortus* » soit comme *Br. abortus*, résistant à la thionine, soit comme *Br. melitensis* atypique, créant ainsi une confusion regrettable.

Pour éclairer cette situation confuse qui est de fait, il nous paraît utile de passer en revue l'ensemble de nos connaissances actuelles sur la morphologie, la composition chimique, antigénique, les activités biochimiques et biologiques des *Brucella*.

Disons-le tout de suite, la plupart des travaux que nous allons énumérer apportent des résultats qui ne peuvent être acceptés que sous caution. En effet, les variations morphologiques des colonies de *Brucella* sont extrêmement nombreuses (Huddleson, 1952, ne décrit-il pas 18 types de colonies de *Br. abortus*, 34 pour *Br. suis* et 19 pour *Br. melitensis* ?) ; elles correspondent à des différences biochimiques, antigéniques et de virulence ; cependant rares sont les publications qui tiennent compte de ces différences et spécifient la phase où se trouvent les souches étudiées.

(1) Ou variétés. Ce point sera discuté plus loin.

MORPHOLOGIE DES *Brucella*.

1° Morphologie microscopique. — *Brucella melitensis* a primitivement été décrit par Bruce comme un microbe « rond ou légèrement ovale » accompagné occasionnellement de formes allongées, et rangé parmi les streptocoques (*Streptococcus milelensis* [sic], Hugues, 1892) ou les microcoques (*Micrococcus melitensis*, Bruce, 1893). *Brucella abortus* a été décrit par Bang (1897) comme un *Bacillus*, *Brucella suis* comme un bacille, aussi. Passant des diphtéroïdes au genre *Bacterium*, par les microcoques ou les *Alcaligenes*, les brucelles, au début de leur reconnaissance, ont subi bien des vicissitudes.

Depuis que A. Evans (1918) a démontré l'identité morphologique de *melitensis* et d' *abortus*, l'accord s'est enfin fait.

La dimension et la forme des *Brucella* dépendent largement de la souche examinée, de l'âge de la culture et du milieu de culture. Il s'agit d'un coco-bacille, gram négatif, qui a de 0,4 à 2,2 μ de long et de 0,4 à 0,8 μ de large. Il n'est pas possible de séparer une « espèce » de l'autre par sa morphologie microscopique, au microscope ordinaire.

Les examens au microscope électronique sont rares, s'agissant des *Brucella*.

Malfatti et Ithurralde (1951) déduisent de l'examen de 63 souches que le microscope électronique permet d'y déceler des différences morphologiques ; malheureusement, les neuf clichés qu'ils publient n'emportent pas la conviction : on y peut déceler un polymorphisme certain, quelle que soit l'espèce représentée sur le cliché. Thiele (1955) se borne à montrer l'utilité possible de l'emploi du microscope électronique appliqué à l'étude des *Brucella*.

Huddleson (1940) décrit une capsule pour *Br. suis*, en phase lisse ou intermédiaire. Malgré les confirmations de Mickles (1940) et de Forster (1950) qui étendent cette constatation aux autres espèces de *Brucella*, il n'y a pas encore de consentement général sur ce point.

2° Morphologie macroscopique. — On doit à Henry (1933) la découverte de la technique qui permet d'étudier la morphologie des colonies de *Brucella* et de séparer les phases lisses, rugueuses, intermédiaires, etc. Mingle et Manthei (1941), Braun et Bonestell (1947) et surtout Huddleson (1952) ont démontré l'importance primordiale de cette méthode, indispensable à toute étude sur les *Brucella*. Les colonies lisses des espèces de *Brucella* ont en commun les caractères suivants : translucides, humides ou onctueuses, colorées de teintes pastel délicates, vert bleu sur la marge avec une zone centrale légèrement rouge jaune. On ne

peut les distinguer les unes des autres que par des nuances fines dans leur coloration. Citons ici encore Huddleson (1952, p. 29, 35 et 44) :

« Colonial type (S). — *Br. abortus*... light value of greenish blue, with a light value of reddish yellow in the central area.

« *Br. suis* light value of greyed green, central area light value of yellow, blending into green.

« *Br. melitensis* light value of greyed bluish green, central area light value of reddish yellow. »

COMPOSITION CHIMIQUE DES *Brucella*.

Il est assez difficile de tirer des conclusions de la composition chimique des *Brucella*. En effet, ou bien les techniques décrites n'ont été utilisées que par un seul auteur, ou bien des publications traitant de fractions isolées par la même technique donnent des résultats qui ne concordent pas.

Lisbonne et Monnier (1936) puis Pop et coll. (Pop et coll., Damboviceanu et coll., Vanghelovici et coll., 1938) ont étudié l'antigène glucido-lipidopolypeptidique de diverses souches de *Brucella*. Les différences constatées dans les dosages des constituants de ces antigènes sont plus importantes d'une souche à l'autre de la même espèce, qu'entre les espèces elles-mêmes. Huddleson et coll. (Huston et coll., 1930 ; Hershey et coll., 1935 ; Pennel et Huddleson, 1937 ; Stalh et coll., 1939) ont poursuivi pendant des années l'étude de constituants chimiques des *Brucella*. Il n'entre, pas dans notre propos d'aujourd'hui de décrire les diverses fractions par eux isolées et examinées. Du point de vue qui nous intéresse, la comparaison entre les espèces de *Brucella*, ces auteurs n'ont pu trouver dans une espèce un constituant qui n'existât point dans les autres. Ils notent, cependant, des différences dans les quantités respectives de ces constituants.

Les mêmes conclusions, c'est-à-dire l'existence dans toutes les espèces de *Brucella* des mêmes composants en quantités variables, s'appliquent aux analyses chimiques de Doubrovskaja (1951, 1954).

COMPOSITION ANTIGÉNIQUE DES *Brucella*.

Elle repose, en l'état actuel, sur le travail classique de Wilson et Miles (1932). A partir de 118 souches, ils choisissent 17 souches absolument lisses, représentant les trois espèces classiques. Par des absorptions croisées des sérums de lapins préparés à partir de ces souches, ils concluent que les antigènes contenus dans *Br. abortus* ou dans *Br. melitensis* sont qualitativement les mêmes, mais différent en quantité.

Les antigènes A et M sont l'un et l'autre présents à la fois dans

Br. melitensis et dans *Br. abortus*. Dans le premier, l'antigène M existe en plus grande quantité que dans le second tandis que *Br. abortus* contient plus d'antigène A. Il n'est pas possible de différencier sérologiquement *Br. suis* de *Br. abortus*. Miles (1933) confirme ces conclusions, d'après des essais utilisant la technique des proportions optimums. Wilson (1933) tente, par l'utilisation simultanée de toutes les techniques, d'établir une classification des *Brucella* et conclut que les souches françaises de *Br. melitensis*, à lui envoyées par le professeur Lisbonne, sont sérologiquement *Br. abortus*.

Silverman et Elberg (1950) essaient de définir les relations entre *Br. suis* et les autres espèces. Utilisant une combinaison de fractionnement chimique des bactéries et des techniques sérologiques quantitatives, ils concluent :

- a) Qu'il existe un antigène rugueux commun aux trois espèces ;
- b) Que le mélange de divers antigènes chez les *Brucella* est démontré ;
- c) Que *Br. suis* contient moins des divers antigènes que les autres espèces ;
- d) Qu'il existe, en toute certitude, une relation étroite entre les fractions obtenues des trois espèces.

Renoux et Mahaffey (1955), par des absorptions croisées, établissent l'existence :

- a) D'un antigène « r » commun à toutes les souches de *Brucella*, le seul qui existerait dans les formes rugueuses de ces bactéries ;
- b) D'un antigène « z », également présent dans toutes les *Brucella* et, en grande quantité, dans *Br. ovis* (Buddle, 1953, 1956).

Ces deux antigènes s'ajoutent aux antigènes A et M déjà connus. Ces mêmes auteurs présentent un schéma concentrique de répartition des antigènes dans les cellules bactériennes des *Brucella* ; ce schéma concentrique rend compte aisément des phénomènes observés. Les diverses « espèces » de *Brucella* ne diffèrent entre elles que par les quantités différentes des divers antigènes. Un peu plus tard, Renoux et Amarasinghe (1955) démontrent que les sérums monospécifiques anti-A ou anti-M réagissent sur les mélanges de *Br. abortus* et *Br. melitensis* comme si ces mélanges ne contenaient qu'une seule espèce, la plus abondante.

ACTIVITÉS BIOCHIMIQUES DES *Brucella*.

Laissant de côté les très nombreuses publications où l'action enzymatique d'une seule espèce, voire même d'une seule souche de *Brucella* a été étudiée, nous nous bornons à ces publications où l'activité de plusieurs espèces de *Brucella* est passée en revue.

Action sur les hydrates de carbone. — Meyer et Shaw (1920) ne trouvent aucune activité des *Brucella* sur aucun des sucres étudiés ; aussi les *Brucella* sont classées dans le genre *Alcaligenes* dans l'édition de 1923 du *Bergey's Manual*.

Mais Mc Alpine et Slanetz (1928), puis Plastringe et Mc Alpine (1930), affirment l'utilisation du glucose par les *Brucella*. Zobell et Meyer (1932) ne trouvent pas de différences d'activité selon l'espèce de *Brucella*, ce que confirme Di Aichelburg (1935) aussi bien pour le glucose que pour 17 autres glucides. Sanders et Huddleson (1950) vérifient que les trois espèces attaquent le glucose, amenant un abaissement du pH pendant les premiers jours d'incubation.

Mc Cullough et Beal (1951), utilisant une technique de « resting-cells » dans l'appareil de Warburg, démontrent l'utilisation de nombreux hydrates de carbone par les trois espèces de *Brucella*.

Plus récemment, Pickett et Nelson (1955) déclarent que, par l'utilisation d'une technique et d'un milieu de base particuliers, il est possible de différencier les espèces de *Brucella* par leurs activités sur l'inositol, le maltose, le rhamnose et le tréhalose. Nous aurions ainsi l'épreuve qualitative qui séparerait valablement les espèces de *Brucella*. Malheureusement, aucune publication n'est venue jusqu'ici confirmer ces constatations. D'autre part, tous les travailleurs qui se sont succédé depuis deux ans dans notre laboratoire ont essayé la méthode de Pickett et Nelson : plusieurs centaines d'essais n'ont donné que des résultats négatifs ne permettant aucune différenciation.

Les *Brucella* ont toutes une réaction de Voges-Proskauer négative.

Réduction des nitrates en nitrites. — Proposée en 1932 par Zobell et Meyer, cette réaction n'a pas encore trouvé sa confirmation.

Dégagement d'hydrogène sulfuré. — Une des techniques de base d'identification des *Brucella*, proposées par Huddleson. Cette méthode montre que *Br. suis* dégage beaucoup de SH_2 , *Br. abortus* moyennement et *Br. melitensis* peu ou pas. Accordant à cette méthode une valeur importante pour la différenciation, van Drimmelen (1953) a proposé le nom de *Br. melitensis*, var. *karakul*, pour ces souches de *Br. melitensis* qui dégagent une quantité importante de SH_2 . Cette dénomination tombe en synonymie avec *Br. melitensis* var. *lisbonnei* que nous avons proposé en 1952 (Renoux, 1952 c).

Activité uréasique. — Trop nombreuses sont les publications pour qu'il soit possible de les citer toutes ici. Toutes sont

d'accord pour reconnaître que les *Brucella* ont une intense activité uréasique, que *Br. suis* est le plus actif, *Br. abortus* le moins actif et que *Br. melitensis* occupe une position intermédiaire.

Activité lipasique et amylasique (Niznanski et Krcmery, 1956). — Les *Brucella* possèdent une lipase et une amylase. Certaines souches ont une activité plus grande que d'autres. Statistiquement, *Br. suis* est le plus riche en lipase. La mesure de ces activités enzymatiques, appliquée à une souche donnée, ne peut qu'être une méthode d'appoint car les variations individuelles sont trop grandes.

Utilisation d'acides aminés. — Gerhardt et coll. (1950), puis Cameron et Meyer (1954) ont étudié l'utilisation d'acides aminés tels que DL-alanine, glycine, arginine, asparagine, acide glutamique par les *Brucella*. Toutes utilisent ces acides aminés dans des proportions semblables.

MÉTHODES DE DIFFÉRENCIATION DES *Brucella*.

Depuis Huddleson, on utilise l'activité bactériostatique de la thionine et de la fuchsine basique pour séparer entre elles les espèces de *Brucella*.

On le sait, cette différenciation repose uniquement sur la quantité de colorant contenu dans le milieu :

1/80 000 de chaque colorant dans le milieu albimi agar,

1/100 000 dans le milieu tryptose agar,

1/50 000 dans la gélose au foie et 1/25 000 dans la gélose à la pomme de terre.

Il est nécessaire que le colorant utilisé soit d'une marque déterminée et que les proportions exactes soient vérifiées. Toute variation dans la quantité de thionine ou de fuchsine entraînera des résultats faux, les *Brucella* se développant ou étant inhibées selon ces variations.

L'emploi du diéthyl-dithiocarbamate de soude (Renoux, 1952 *a*) permet de différencier les espèces de *Brucella* selon les anneaux d'inhibition constatés. Là encore une gélose trop ou pas assez épaisse, une différence dans la quantité de DEDTC utilisée amènent infailliblement des résultats contradictoires.

Le besoin de CO₂ pour se développer est un caractère important de *Br. abortus*. Cependant, la plupart des souches perdent ce caractère après quelques repiquages ; ce caractère est d'ordre génétique et le taux de mutation de formes qui n'ont pas besoin de CO₂ permet le remplacement rapide. Bien des souches de *Br. abortus* peuvent se développer en l'absence de CO₂, dès l'origine.

POUVOIR PATHOGÈNE DES *Brucella*.

S'agissant d'un microbe, agent d'une maladie infectieuse, le pouvoir pathogène correspondrait un peu au biotope des animaux supérieurs et serait donc d'une aide certaine pour la classification de ce microbe. « En fin d'analyse, le seul caractère spécifique qui nous reste pour définir un microbe pathogène est son pouvoir pathogène, c'est-à-dire sa *virulence* » (Ch. Nicolle).

Or, le premier rapport du Comité d'Experts FAO/OMS de la Brucellose (1951) dit : « Bien que *Br. abortus* infecte en général les bovidés, *Br. suis* les porcins et *Br. melitensis* les caprins, les infections par l'une quelconque de ces trois espèces de *Brucella* peuvent survenir chez tous les animaux domestiques et chez l'homme. »

Les formes cliniques de la brucellose humaine ou animale sont similaires. Les différences de virulence que l'on peut constater sont sous la dépendance d'une souche donnée et non pas de l'espèce à laquelle elle appartient.

De cette revue rapide ressort donc l'impression qu'il n'y a pas entre les diverses espèces de *Brucella* de critères qui permettent de les séparer aisément.

Ainsi la séparation en espèces tranchées des *Brucella* serait, sur le plan scientifique, à peu près le seul exemple connu d'une classification qui reposerait strictement et seulement sur l'aspect quantitatif des critères choisis.

Si nous pouvons démontrer que ces critères quantitatifs sont utilisables, qu'ils permettent une bonne et correcte identification des souches de *Brucella*, il n'y a pas grand mal. Reconnaisant implicitement l'imperfection relative de nos méthodes, nous aurons, cependant, une classification des *Brucella* acceptable et utile en pratique. Est-ce bien le cas ?

Comme nous l'avons déjà dit, au début de l'histoire des *Brucella*, l'éloignement géographique des découvertes, les espèces animales-hôtes fort différentes, tout cela avait contribué à classer ces bactéries fort loin l'une de l'autre, dans des genres différents. Evans, Meyer, Burnet avaient démontré plus tard les profondes ressemblances qui existaient entre les agents de l'avortement épizootique des vaches, de la fièvre de Malte chez les chèvres et celui de l'avortement des truies. Huddleson avait ensuite apporté les clés qui permettaient une classification des souches, les élevant au rang d'espèce.

Cette classification repose, répétons-le, sur : le besoin ou non de CO_2 pour la culture, l'action inhibitrice de la thionine et de la fuchsine basique, le dégagement de SH_2 . Ajoutons-y l'action des sérums monospécifiques adsorbés anti-A et anti-M.

L'emploi de ces réactifs sépare donc au moins quatre espèces

de *Brucella* : *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis* (avec la variété danoise qui ne dégage pas de SH_2) et *Br. intermedia*. Mais ces mêmes réactifs, selon le résultat de leur emploi, permettent d'établir 64 schémas différents (Renoux et coll., 1955). Au nom de quelle juridiction, pourquoi 3 ou 4 de ces schémas ont-ils seuls valeur d'espèce ?

C'est vraisemblablement grâce à l'introduction dans le genre *Brucella* d'une notion nouvelle, celle de la fréquence statistique. Alors que pour bien des genres zoologiques botaniques ou microbiens, il est admis de décrire des espèces ou des variétés sur un seul échantillon, quand il s'agit de *Brucella*, il semble bien que la fréquence d'un ensemble de caractères ait été prise en considération pour définir les espèces. Seuls, jusqu'ici, 3 des 64 schémas possibles, les plus communément rencontrés au moment où fut établie la classification actuelle, jouissent du privilège de définir des espèces de *Brucella*. Nous avons tenté d'introduire un quatrième schéma, celui de *Br. intermedia*.

Sur ces bases, nous nous trouvons en ce qui concerne les *Brucella*, enfermés dans un dilemme :

ou les schémas d'identification ont une réelle valeur de discrimination intraspécifique et il y a donc autant d'espèces de *Brucella* que de schémas possibles ;

ou l'on considère que ces schémas n'ont qu'une valeur relative ; on a alors affaire à une seule espèce bactériologique, *Brucella melitensis*, les autres schémas correspondant à autant de variétés.

Les schémas d'identification des *Brucella* ont-ils une valeur fixe ? Nous l'avons vu, ils reposent tous sur des différences quantitatives. Toutes les *Brucella* ont en commun les mêmes caractéristiques biochimiques, virulentes, antigéniques.

D'autre part, ces caractéristiques peuvent varier pour une souche donnée. Ces variations ont pu être observées expérimentalement :

a) *In vitro* (Lisbonne et coll., 1938 ; Marr et Wilson, 1950 ; Renoux et coll., 1952 ; Braun et Oglesby, 1954 ; Nyieredi, 1954 ; Parnas, 1957). Par des artifices simples, on peut obtenir des modifications des caractères « huddlesoniens » des souches de *Brucella* (2). Par exemple, on donnera à *Br. abortus* l'aptitude à pousser sur milieu à la thionine, l'identifiant ainsi à *Br. melitensis* ; *Br. melitensis* deviendra capable de donner un abondant dégagement de SH_2 , etc.

(2) Huddleson (1952, p. 14) confirme ces résultats : « Most of the strains of *Br. suis* which the writer has studied can be adapted to grow just as well on basic fuchsin agar as on thionin agar... The newly acquired growth characteristic remains permanent. »

Marr et Wilson ont démontré que le besoin en CO_2 est une aptitude génétique, soumise à mutation (taux de mutation = 2×10^{-10}). Braun et Oglesby, étudiant les souches « aberrantes » en présence de colorants inhibiteurs, démontrent qu'il s'agit de mutants vrais, préexistant dans la souche d'origine : « Des souches typiques de *Br. abortus* et de *Br. suis* mutent spontanément en résistance aux colorants (thionine et fuchsine respectivement) selon un taux moyen de mutation de 6×10^{-10} . La plupart des mutants résistants, et aussi les mutants dont les besoins en CO_2 ont changé, luttent avec succès *in vivo* contre leurs parents typiques ».

b) *In vivo*. Comme Braun et Oglesby le disent et le démontrent sur le cobaye : « On peut penser que, sous certaines conditions de milieu environnant, peut-être chez certains hôtes, ces types aberrants pourraient atteindre une très haute valeur sélective et ainsi remplacer leur parent typique ». Cette hypothèse était aussi celle soulevée par Wilson (1933) d'après les résultats d'identification qu'il avait obtenus : « L'isolement de trois souches bovines qui réagissent comme *melitensis* aux épreuves bactériostatiques et de dégagement de SH_2 et comme *abortus* aux épreuves sérologiques suggère, soit que ces animaux ont été infectés par des chèvres ou des moutons hébergeant le même type de souche, soit que ces vaches ont été infectées par des souches de *melitensis* typiques qui ont subi, dans leurs tissus, un changement antigénique ». Wilson et Evars (1936) ont réussi, une fois, à transformer *B. melitensis* en *Br. abortus* par passage à une vache pleine, tandis que Renoux, Carrère et Quatrefage (1952) obtenaient la transformation de *Br. abortus* en *Br. melitensis* par passage en série au mouton et que Washko et coll. (1951) modifiaient *Br. abortus* en *Br. suis* par passages au porc. Cette dernière expérience est confirmée par Bunnell (1955).

On objecte que, s'agissant d'expériences *in vivo*, il subsiste toujours le risque d'une contamination accidentelle des animaux et que ces résultats ne sauraient s'opposer aux expériences où une souche, ayant conservé tous ses caractères, se retrouve, même après plusieurs passages, chez l'animal hôte. A quoi l'on peut, avec quelque raison semble-t-il, rétorquer que, puisque le taux de mutation est faible (10^{-10}) et qu'il faut que le mutant supplante la souche d'origine, il est assez naturel que peu d'expériences aient pu démontrer de telles transformations. De plus, très peu d'auteurs se sont intéressés à ce problème, cependant primordial, et peu d'essais ont été tentés. La plasticité réelle des *Brucella* permet seule de rendre compte de faits tels que l'isolement de *Br. suis* de lièvres naturellement infectés dans des régions où l'infection par cette espèce de *Brucella* était inconnue (Jacotot et Vallée, 1951 a, b et c ; Roux et Bouvier, 1946 ; Bou-

vier et coll., 1951, 1952, 1954 ; Burgisser, 1949 ; Renoux, 1957). Dans un article courageux, Jacotot et Vallée (1954) attirent l'attention sur cette plasticité, en publiant les résultats différents d'identification des mêmes souches par plusieurs laboratoires.

Aux expériences *in vitro* on objecte que la torture subie par les microbes ne peut, en aucun cas, être comparée à ce qui se passe dans la nature.

Or, que se passe-t-il dans la nature ?

I. Tous les auteurs, plus ou moins explicitement, s'accordent à reconnaître que les résultats d'identification ne sont pas toujours semblables quand on les répète. « De nombreux examens des souches, même après plusieurs années de conservation sous forme desséchée, donnent *presque toujours* des résultats identiques aux résultats originaux » (Stableforth, 1952). Nous venons de rapporter les intéressantes constatations de Jacotot et Vallée (1954).

II. On sait depuis longtemps que, lorsqu'on veut identifier des cultures d'une même souche de *Brucella*, les résultats seront différents selon qu'on s'adressera à des colonies en phase S, SI, M, R, etc. Il est nécessaire d'utiliser des souches sûrement lisses pour obtenir des identifications correctes. En ce cas, comment identifier à coup sûr les variants *non smooth* apparus d'emblée, car Berman et coll. (1955) démontrent qu'on peut isoler de tels variants purs de l'animal ?

III. Supposées levées toutes les difficultés ci-dessus énumérées, de bonnes techniques étant employées, tous les auteurs constatent un certain nombre de souches atypiques ou inclassables. On peut résumer en un tableau ces diverses constatations, sans entrer dans les détails qui font considérer ces souches comme atypiques par les auteurs cités (tableau II).

Les variations des pourcentages s'expliquent par le fait que tous les auteurs cités n'utilisent pas toutes les techniques. L'omission, trop fréquente, des réactions sérologiques diminue évidemment le nombre des souches aberrantes en ignorant systématiquement toutes les *Brucella* dont l'identification sérologique ne correspond pas à l'identification biochimique.

IV. De nombreux auteurs décrivent des souches de *Brucella* dont les caractères ne correspondent pas à ceux des trois espèces habituelles, *Br. melitensis*, *Br. abortus* ou *Br. suis*. Dans une publication récente (Renoux et coll., 1955) nous donnons un résumé de la plupart des publications relatives à de telles souches.

Sans entrer à nouveau dans le détail, relevons les caractères les plus fréquemment rencontrés :

a) Thionine +, fuchsine +, aggl. A. C'est *Br. intermedia* dont nous avons déjà parlé.

b) Thionine —, fuchsine +, CO₂ + ou —, aggl. M. De telles souches, biochimiquement *abortus*, sérologiquement *melitensis*, sont assez fréquentes. Elles ont été isolées d'humains ou de

TABLEAU II.

Auteurs	Nombre de souches examinées	Nombre de souches atypiques	Pourcentage
TAYLOR, LISBONNE et ROMAN (1932)	256	12	5
VEAZIE et MEYER (1936)	426	67	15,7
RITA et DELLA VIDA (1951)	176	22	12,5
RENOUX (1952)	1 974	94	5
STABLEFORTH (1952)	?	28	?
PICKETT, NELSON et LIBERMAN (1953)	232	18	7,7
CRUICKSHANK (1954)	800	111	13,8
GARGANI et DONALDI (1954)	178	17	9,5
MONELLI (1954)	35	2	5,7
NEGRI et VON LORCH (1955)	52	11	20
RENOUX, SACQUET et AMARASINGHE (1955)	364	31 (1)	8
GARGANI, BENELLI et GUERRA (1957)	119	101	84,8

(1) En considérant *Br. intermedia* comme une espèce valable de *Brucella*. Sinon, le nombre de souches atypiques est de 261 sur 364 examinées. Ainsi, le pourcentage de souches aberrantes rejoindrait celui de Gargani et coll. (1957).

bovins (quand la source est connue) en Argentine, Etats-Unis d'Amérique, Espagne, France, Grande-Bretagne, Israël, Italie, Portugal, U. R. S. S., et étudiées par Veazie et Meyer (1936), Wilson (1933), Renoux (1955), Cruickshank (1954).

c) Thionine +, fuchsine +, CO₂ +, DEDTC *melit.*, aggl. —. Ces souches correspondent aux souches de la maladie génitale des ovins en Australie (Simmons et Hall, 1953), Nouvelle-Zélande (Buddle et Boyes, 1953) et en Californie (Mc Gowan et Shultz, 1956). Elles ne sont pas agglutinées par les sérums anti-*Brucella* usuels. Nous avons pu démontrer qu'elles contenaient cependant un antigène « z » commun à toutes les *Brucella* (Renoux et Mahaffey, 1955). Buddle (1956) a proposé, au moins provisoirement, le nom de *Brucella ovis* pour de telles souches qui créent naturellement ou expérimentalement chez les animaux une maladie tout à fait semblable à la brucellose.

V. L'absence de consentement général, le refus de suivre une

ligne de conduite commune font que des souches de *Brucella* ayant les mêmes caractéristiques ont reçu des noms différents selon le pays ou l'espèce animale où elles ont été isolées.

Bevan (1930) isole de vaches en Rhodésie du sud des souches qui sont thionine résistantes, n'ont pas besoin de CO₂ pour se développer. Cet auteur les classe *Br. abortus*. Cependant rien ne les distingue des souches de *Br. melitensis*, d'origine humaine caprine ou bovine, isolées en France, agglutinées par le sérum anti-*abortus* et examinées par Wilson (1933). Le même type de « *Br. abortus* résistant à la thionine » a été trouvé à Sumatra par van den Schaff et Rosa (1940), en Inde par Polding (1950), au Congo Belge par Vandepitte et Wiktor (1951). Antérieurement, Zdrodowski et coll. (1930) écrivent : « Des souches de *Br. melitensis* se rencontrent qui ne se différencient presque pas de *Br. abortus*, du moins par la méthode sérologique. Ce dernier type de *Br. melitensis*, non différencié sérologiquement de *Br. abortus* est habituel, par exemple, en Azerbaïdjan, quoique les chèvres et les moutons représentent dans ce pays le réservoir de virus principal pour l'infection humaine. » Plus loin, dans la même publication, nous trouvons : « Le Dr V. Makaveisky, de Vitebsk, nous a remis une culture de *Br. abortus* qu'il a isolé du sang d'un vétérinaire ayant été contaminé par une vache atteinte d'avortement épizootique. Ce cas s'est produit dans une contrée très éloignée de foyers endémiques de mélitococcie et peut être interprété comme un cas d'infection presque expérimentale par *Br. abortus* d'origine bovine. La culture isolée a été examinée à notre Institut d'après la méthode de l'absorption des agglutinines (Dr H. Brenn). Les résultats obtenus ont été tout à fait inattendus. Malgré son origine bovine, la culture a été identifiée aux souches étalons de *Br. melitensis* et en même temps elle a été très nettement différenciée des cultures typiques de *Br. abortus*. »

Plus récemment, Cruickshank (1954) classe de telles souches, selon leur origine géographique : les unes sont *Br. melitensis* agglutination *abortus*, les autres *Br. abortus* résistant à la thionine.

Ce sont des raisons de logique qui nous ont amené à proposer pour ce groupe le nom de *Br. intermedia*.

Donc, tout ceci laisse l'impression d'une certaine confusion. Tout se passe comme si, cédant aux facilités apparentes de la seule utilisation pratique, la plupart des auteurs oubliaient les règles sur quoi se base une classification bactériologique et la séparation en espèces distinctes.

Nous pensons avoir clairement montré, qu'en l'état actuel de nos connaissances, il n'existait aucune preuve de l'existence d'une différence qualitative entre les diverses souches de *Brucella*.

Cependant, il existe de nombreuses preuves de la variabilité des *Brucella*. « On note spécialement dans le présent travail que ces variations sont souvent liées à une localisation géographique spéciale, ce qui suggère que les organismes du groupe *Brucella* sont particulièrement susceptibles aux changements de milieu. » [Wilson (1933)]. Braun et Oglesby (1954) insistent sur le fait que « les caractéristiques diagnostiques acceptées sont sujettes à changement par mutation spontanée et beaucoup des souches aberrantes qui en résultent possèdent une valeur sélective considérable *in vivo*. Par conséquent, ces observations insistent à nouveau sur les dangers qu'il y a à utiliser, à des fins taxonomiques, des caractères sujets à des mutations simples et ajoutent du poids à l'argument que les espèces actuellement connues de *Brucella* représentent des variétés plutôt que des espèces valables. Cependant, d'un point de vue pratique, il peut y avoir quelque utilité à conserver les soi-disant espèces de *Br. abortus*, *Br. suis* et *Br. melitensis* comme étalons de référence, même si elles ne représentent essentiellement que les biotypes les plus communs d'une seule espèce ».

De tout ce qui précède on peut tirer les éléments suivants :

1° Aucune caractéristique connue n'est propre à une espèce de *Brucella*, pas même la fermentation de certains glucides, réaction qui n'a pu être confirmée.

2° Il est possible d'obtenir expérimentalement des variations importantes dans les caractères d'identification d'une souche.

3° On a pu constater des variations analogues apparues spontanément.

4° On a pu démontrer, au moins pour certains des caractères d'identification, qu'ils étaient soumis à mutation simple.

5° Un grand nombre de souches ne peuvent être classées, sans arbitraire, parmi les « espèces » de *Brucella*.

6° Selon l'origine géographique, selon l'espèce animale d'où elle est isolée, on peut voir des souches de *Brucella*, ayant des caractères identiques, recevoir des dénominations différentes. Un même auteur, dans la même publication classe des souches ayant les caractères « T +, F +, H₂S —, CO₂ —, agglutination A » comme étant *Br. melitensis*, ou *Br. abortus* thionine résistant, selon leur pays d'origine.

Ainsi, selon la fantaisie qui aurait présidé à l'étiquetage des tubes, plusieurs exemplaires d'une même souche pourraient porter des dénominations différentes. Il est clair que c'est une attitude peu scientifique que celle qui consiste à classer une souche microbienne selon la ville où l'on habite.

La force de l'habitude est pour beaucoup dans une telle attitude.

7° On peut trouver dans la littérature mention fréquente de types de *Brucella* qui ne sont pas encore dénommés. Citons, pour ne donner ici encore qu'un seul exemple, les souches « T — F +, agglutinées par le sérum anti-M ». De telles souches ont été isolées de cas humains ou bovins dans de nombreux pays d'Europe, d'Asie, d'Amérique du Nord ou du Sud (Wilson, 1933 ; Veazie et Meyer, 1936 ; Stableforth, 1952 ; Cruickshank, 1954 ; Renoux, 1955). Leur nombre est-il suffisant pour que nous en fassions une « espèce », une variété de *Brucella* ou bien devons-nous toujours considérer ces souches comme n'étant pas typiques, comme étant inclassables ?

8° Sur 64 schémas d'identification possibles, 3 seulement grâce à l'introduction — et seulement dans le passé — de la notion de fréquence, caractérisent les espèces.

9° Aucune différence actuellement connue n'est qualitative.

Nous nous trouvons donc avoir à faire face à une situation apparemment embrouillée. Mais le besoin de classification et d'ordre fait partie de la nature de l'homme et nous ne saurions nous contenter d'un constat d'impuissance.

En attendant que d'autres moyens d'investigations — et il s'en découvrira certainement — facilitent et permettent une classification sûre, il nous est donc indispensable d'adopter une attitude logique et pratique.

Il y a quelques années (Renoux, 1952 c) frappé déjà par les constatations que nous venons de résumer brièvement, nous proposons de grouper toutes les *Brucella* en une espèce unique, *Br. brucei*, et que les « espèces » actuelles soient considérées comme étant des variétés. Par exemple, l'actuel *Br. melitensis* serait devenu *Br. brucei*, var. *melitensis*. Une telle classification avait le mérite de simplifier le problème en permettant de trouver une case pour chaque souche atypique (étant sous-entendu que de telles souches étaient correctement identifiées). L'acceptation par tous de cette classification, malgré le risque de voir apparaître un grand nombre de variétés comme cela se passe pour les *Salmonella*, revenait à insister sur l'unité profonde de la brucellose à travers tous les hôtes que les *Brucella* sont susceptibles d'attaquer.

J'avais alors commis une erreur de quelque importance : *Br. brucei* tombe en synonymie avec *Br. melitensis* qui, par droit d'antériorité manifeste, est la seule dénomination qui puisse être employée. Cependant, force est de reconnaître que cette idée a fait son chemin et que de nombreux auteurs suivent cette nouvelle dénomination dont on reconnaît ainsi l'utilité.

L'état actuel de la discussion peut être résumé comme suit :

1° Si l'on admet, d'une part que les épreuves d'identification sont valables, d'autre part que le critère de fréquence est nécessaire pour définir une espèce de *Brucella*, il faut ajouter de nouvelles espèces aux espèces jusqu'ici reconnues.

2° Toujours si l'on admet que les épreuves d'identification sont valables, la constatation que des artifices expérimentaux aient pu modifier les caractères des *Brucella* amène à conclure que ces bacilles ont une grande plasticité, donc qu'il est difficile de séparer le genre *Brucella* en espèces (3).

3° Enfin, on peut se demander si les techniques employées sont suffisamment précises pour justifier l'habitude de séparer les *Brucella* en espèces distinctes.

Il y a longtemps déjà, A. Evans (1918, 1923, 1925), Meyer et Shaw (1920) et Burnet (1923) concluaient que les souches d'*abortus* et de *melitensis* ne sont pas des espèces bactériologiques distinctes mais essentiellement des variétés ou des sous-espèces d'une seule et unique espèce. Opinion reprise par Renoux (1952), Renoux et coll. (1952, 1955), Braun et Oglesby (1954).

En l'état actuel de nos connaissances, les seules attitudes possibles, relatives à la classification des *Brucella*, sont :

1° Tous les caractères d'identification, qu'ils soient biochimiques ou sérologiques, sont fixes ; ils représentent donc des critères valables. La conséquence logique et inéluctable est qu'il y a autant d'espèces de *Brucella* que de schémas possibles. Le fait qu'on sache que n'importe quel « type » de *Brucella* peut être isolé de n'importe quel animal sensible exclut sans recours l'artifice qui consiste à tenir compte de l'espèce animale d'où la souche a été isolée pour donner un nom à cette souche : comment faire quand cette origine animale n'est pas connue ?

2° Seuls certains des caractères d'identification sont valables : les autres n'auraient qu'une valeur très relative d'appoint et varieraient aisément. Reste alors à désigner les critères seuls valables et utilisables. Une fois cet accord obtenu, il sera facile de reclasser les souches de *Brucella*. Le problème est justement de fixer cette hiérarchie ; il paraît bien que les divers auteurs ne soient pas encore tout à fait d'accord. Cette hiérarchie une fois fixée, nous retombons dans l'hypothèse n° 1 ci-dessus : à chaque schéma doit correspondre une espèce.

3° On peut admettre avoir à faire à une espèce unique, *Br. melitensis*, riche en « jordanons ». C'est une hypothèse couramment admise en botanique ou en zoologie. Dans cette hypothèse,

(3) Luria (1947) insiste longuement sur le danger qu'il y a d'utiliser à des fins taxonomiques des caractères susceptibles d'être modifiés par des mutations simples.

autour des caractères typiques de l'espèce, nous pouvons placer toute une série de sous-espèces, variétés ou types qui diffèrent de l'espèce par quelque caractère. Les caractéristiques de l'espèce ainsi définie s'expriment dans une phrase de Jordan et Kellogg, citée par A. Evans :

« A series of fully intergrading forms, however, varied at the extremes, is usually regarded as forming a distinct species... If we find actual intergradation, the occurrence of specimens intermediate in structure, the term subspecies is commonly used for each of the recognizable groups thus connected. »

Cette attitude, la plus ancienne, paraît celle qui se justifie le mieux : n'importe quelle *Brucella* peut infecter n'importe quelle espèce sensible ; il existe un grand nombre d' « inclassables » ; des souches de *Br. melitensis* isolées d'un grand nombre de pays sont agglutinées par le sérum anti-*abortus* ; nous ne connaissons aucun caractère qui soit propre à une *Brucella* donnée ; on pourrait multiplier les exemples, répétant ainsi les faits exposés dans le présent travail.

Toute tentative pour essayer de justifier l'existence de deux ou trois espèces seulement de *Brucella* fournira autant d'arguments pour justifier la création d'autant d'espèces qu'on isolera de souches qui, par un ou des caractères, diffèreraient du schéma admis pour identifier une espèce.

On a pu et pourra encore soutenir que, pour des raisons pratiques, il est nécessaire de conserver les espèces habituellement admises. Cette opinion est sans valeur réelle. Répétons que, si l'on suit cette opinion, une même souche « T+, F+, aggl. A » est actuellement classée *Br. melitensis*, *Br. abortus* ou *Br. intermedia* suivant celui qui l'étudiera et la ville où il habite ; de plus, *Br. melitensis* ne serait pas une espèce de *Brucella* dans plusieurs pays où cette espèce n'est pas, ou rarement isolée.

Enfin, du point de vue pratique, quelle est l'attitude la meilleure : donner un nom précis à une variété bien caractérisée ou se tenir dans le vague d'une dénomination arbitraire attribuée à une souche « atypique » ?

Deux points sont à considérer en microbiologie, quelles que soient les bactéries considérées :

1° Assurer une base solide, eu égard aux connaissances du moment, à la détermination et à la classification des bactéries ;

2° Utiliser ces bases scientifiques à des applications pratiques (4).

Le fait de dire qu'il n'y a qu'une espèce de *Brucella* : *Br.*

(4) Le second point découle naturellement du premier. C'est une erreur grave que d'essayer d'utiliser le second point à la solution du premier ou de faire découler le premier point du second.

melitensis, ou tout autre nom qu'on lui voudra donner, et que cette espèce comprend un grand nombre de variétés ou types, aurait l'avantage de clarifier une situation passablement embrouillée.

Cette attitude ne gênerait en rien les applications pratiques :

a) L'identification de « variétés » continuerait à rendre les très grands services qu'elle a donnés jusqu'ici ;

b) La situation serait plus franche, la détermination de variété conserve toute son importance épidémiologique, mais toutes les *Brucella*, puisqu'elles ont les mêmes caractéristiques générales, porteraient le même nom. Grâce à quoi on ne verrait pas déclarer qu'un malade est atteint de brucellose à *Br. abortus*, parce que son sérodiagnostic a été fait avec un antigène *abortus*, on ne verrait pas certains pays déclarer dangereuse la mélitococcie (brucellose caprine ou ovine à *Br. melitensis*) et inoffensive la fièvre ondulante bovine (= due à *Br. abortus*).

En 1955, nous concluons :

« Nous voudrions bien qu'on ne se méprenne pas sur le but du présent travail : il ne s'agit ni d'attaquer des méthodes qui ont fait leurs preuves, ni de caresser le vain orgueil de dénommer quelques douzaines de nouvelles espèces bactériennes.

Notre seul but est d'attirer l'attention sur une confusion qui s'installe insidieusement dans la classification des Brucelles, de poser des questions portant à la fois sur la valeur et la hiérarchie propres des épreuves jusqu'ici proposées, de demander qu'on se mette d'accord sur deux problèmes à la fois distincts et connexes :

1° Quelles sont les bases scientifiques qui permettent de différencier les *Brucella* en espèces distinctes ; par conséquent, quelle est la hiérarchie des épreuves d'identification ?

2° D'après ces bases, quelles sont les limites et l'utilité pratique de la différenciation des *Brucella* ?

Des réponses qui seront données à ces questions dépend, en toute certitude, l'évolution de nos connaissances sur les Brucelles, par voie de conséquences, l'avenir de la lutte contre la brucellose. »

Aujourd'hui, nous pensons pouvoir conclure d'après les critères le plus généralement adoptés pour la classification des microbes, qu'en ce qui concerne les *Brucella* (et au risque de nous répéter) :

a) Il n'existe aucun accord sur le choix des épreuves qui permettraient une discrimination spécifique. Cet accord existerait-il que le problème même de la définition de l'espèce dans le genre *Brucella* subsisterait.

b) Aucune des caractéristiques connues, chimiques, antigéniques, biochimiques, virulentes, n'est propre à une *Brucella*.

c) L'action bactériostatique des colorants et le besoin en CO_2 sont sous l'influence de mutations simples.

d) Il subsiste un trop grand nombre de souches atypiques ou aberrantes, étiquetées au gré de chacun.

e) Les auteurs qui ont créé le genre *Brucella* ne reconnaissaient qu'une espèce valide, subdivisée en variétés.

Nous pensons donc qu'une classification du genre *Brucella* devrait reposer sur les bases suivantes :

1° Application des méthodes apportées par Huddleson. Ces méthodes ont rendu, et doivent continuer à rendre des services inestimables. Toute nouvelle technique éventuellement proposée devra être comparée à ces techniques « huddlesoniennes ».

Nous ne saurions assez répéter à quel point l'emploi, pour la classification des *Brucella*, des méthodes de Huddleson est indispensable. Rien de ce que nous avons dit sur la notion d'espèce dans le genre *Brucella* ne saurait atténuer l'extrême importance pratique, usuelle, de ces techniques d'identification.

2° Application systématique, comme pour toutes les autres bactéries, de l'identification sérologique. Nous n'avons pas le droit de nous passer délibérément des renseignements d'importance primordiale fournis par la constitution antigénique des *Brucella*.

Le genre *Brucella* serait ainsi défini :

Genre *Brucella* : Meyer et Shaw.

Petits cocco-bacilles Gram négatifs, non sporulés. Immobiles. Développement difficile sur les milieux ordinaires. Peuvent nécessiter des milieux de culture spéciaux. Aérobie, ils ne se cultivent pas en anaérobiose stricte. Les cultures ne sont souvent possibles qu'en présence de CO_2 . Dans les milieux habituels la fermentation des sucres est faible ou absente. Parasites stricts de l'homme et des animaux, ils y créent des infections caractéristiques.

Espèce unique : *Brucella melitensis*.

Variétés usuelles : *Br. melitensis*, var. *melitensis* (Bruce, 1887) ; *Br. melitensis*, var. *abortus* (Bang, 1897) ; *Br. melitensis*, var. *suis* (Traum, 1914) ; *Br. melitensis*, var. *thomsoni*, ancien type danois (Thomsen, 1931) ; *Br. melitensis*, var. *intermedia* (Renoux, 1952 b) ; *Br. melitensis*, var. *ovis* (Buddle, 1956), à quoi pourraient aisément s'ajouter toutes les variétés encore non classées.

Une telle classification aurait, répétons-le, le mérite de satisfaire à la fois aux besoins de la nomenclature scientifique et aux nécessités de la clinique humaine ou vétérinaire.

Rappelons-le, c'est essentiellement, et selon le mot du manuel de Topley et Wilson, pour des « raisons de commodité » que la différenciation des *Brucella* en espèces avait été admise. Il apparaît bien, maintenant, que pour les mêmes raisons de commodité cette habitude mérite d'être changée.

L'attitude que nous adoptons permet le plus simplement du monde de passer d'une dénomination clinique simple indispensable au médecin, au vétérinaire ou à l'hygiéniste, à une dénomination scientifique plus exacte, tout en sauvegardant la profonde unité qui joint entre elles les diverses brucelloses et les différentes *Brucella*.

RÉSUMÉ.

En l'état actuel de nos connaissances, il n'existe aucune caractéristique morphologique, biochimique, antigénique ou de virulence qui soit propre à une *Brucella* quelconque. En sens inverse, un fort faisceau de présomptions laisse à penser que les « espèces » actuellement connues de *Brucella* ne sont que les biotypes d'une espèce unique.

En outre, l'absence complète d'un agrément général sur la valeur respective des diverses épreuves d'identification des *Brucella* aboutit à une réelle confusion ; les très nombreuses souches « atypiques » ou « aberrantes » reçoivent des dénominations subjectives qui dépendent plus de l'opinion des auteurs que des faits observés.

Cependant, tous les auteurs dont les travaux sont à la base même de la création du genre *Brucella* estimaient qu'il n'y avait qu'une seule espèce, *Br. melitensis*, accompagnée d'un certain nombre de variétés.

Cette attitude paraît la seule logique.

Nous proposons donc que le genre *Brucella* soit révisé :

Genre *Brucella* (Meyer et Shaw). Espèce unique : *Br. melitensis*.

Toute souche de *Brucella* dont les caractères, après un contrôle soigneux, diffèrent de *Br. melitensis* est une variété.

Cette classification a le mérite de la simplicité et de la clarté.

SUMMARY

THE CONCEPT OF SPECIES IN THE GENUS *Brucella*.

« The unit of classification is a coherent group of like individuals, called a species. The term is difficult to define with precision because a species is not a definite entity, but a taxonomic concept » (Hitchcock). In animals as in plants, it is sometimes difficult to assess the exact place of a given specimen. We must realize that, regarding bacteria, our task is far more difficult as we still miss all the morphological, sexual and biotopic criteria, so useful in Botany and Zoology. The classification of Bacteria into species is, at the present time, merely related to nutritional,

i. e. metabolic, characteristics. Bacterial classification is essentially a matter of personal opinion, of common sense and of general agreement. It is not based on truly scientific rules.

But we can agree on some statements. We can probably accept as basis for the definition of a bacterial species the following criteria :

Each distinct kind of bacterium is called a species.

Characters applicable to the differentiation of species must evidence a certain amount of constancy when studied over a large series of tests. Furthermore, these characters must show some correlation with other constant characteristics.

Classification cannot, in any case, be based upon the choice of only one characteristic.

A bacterial classification must not be based upon characters which are subject to simple mutational changes.

On these grounds, the study of the genus *Brucella* (discarding *Br. bronchiseptica* and *Br. tularensis*) shows us :

1° When the history of *Brucella* started, these bacteria were classified as very distinct organisms not, even, belonging to the same genus. But, Evans, Meyer, and Burnet demonstrated the identity of these so-called different bacteria.

2° It is impossible to-day, probably because the data are still so scanty, to find any qualitative difference between the accepted *Brucella* species regarding chemical components, metabolic requirements or antigenic structure.

3° Any *Brucella* is able to infect any susceptible animal.

4° All the biochemical tests employed as differential tests are quantitative ones. Unfortunately, the sugar fermentation test does not work.

5° When monospecific sera are used for the classification of *Brucella* (the antigenic pattern of any bacterium is really useful for its identification), the results of such serological tests do not always correspond to the results of the biochemical tests.

6° The commonly accepted identification tests comprise 64 different identification patterns. Only three are accepted as being species, because they were the first studied.

7° Experimental findings demonstrate how easily dye tests or other characters may change. They are simple mutational changes.

8° Spontaneous changes have been observed.

9° A great number of *Brucella* strains cannot be classified under the three « species » of *Brucella*. They are called atypical or aberrant strains. Many bacteriologists prefer such names, rather than using monospecific sera and suffering an upset of their routine habits.

10° In the literature, we may read descriptions of strains presenting identical characters, but bearing different names, according to the personal opinion of the author.

Thus, if we admit the validity of all the identification tests for *Brucella*, we must recognize quite a number of species besides the three current ones : as many of them indeed as there are different combinations of these tests. If, on the other hand, we only recognize the validity of a few particular tests, we must agree on the choice of such tests. Such an agreement will allow the description of numerous *Brucella* species, each corresponding to one of the adopted test combinations.

It seems to us that such an attitude will lead to the recognition of a tremendous number of species without any interest from the scientific or practical point of view. This however is the logical consequence of our present conception. It is impossible to agree on so many atypical or aberrant strains as now described in literature, some of them designed under two or three different names, according to the laboratory where they are studied.

In order to avoid misunderstandings and to allow a correct classification of *Brucella* strains, we propose a clearer and simpler classification. It is a return to the early classification (Evans, Meyer). All the so-called species of *Brucella* are biotypes of only one species.

A strain of *Brucella* should be identified by the biochemical tests of Huddleson and monospecific sera. Any new test should be carefully compared with these tests.

On these grounds, we shall have :

Genus *Brucella* (Meyer and Shaw).

Only one species : *Brucella melitensis*.

Any strain with different characters is a variety.

BIBLIOGRAPHIE

- BANG (B.). *Z. Tiermed.*, 1897, **1**, 241.
 BERMAN (D. T.), REDFEARN (M. S.) et SIMON (E. M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **88**, 526.
 BEVAN (L. E. W.). *Brit. med. J.*, 1930, **2**, 267.
 BOUVIER (G.), BURGISSER (H.) et SCHNEIDER (P. A.). *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 1952, **94**, 475.
 BOUVIER (G.), BURGISSER (H.) et SCHNEIDER (P. A.). *Monographie des Maladies du Lièvre en Suisse*. Serv. vet. Cant. et Inst. Galli Valerio, Lausanne, 1954.
 BOUVIER (G.), BURGISSER (H.) et SCHNEIDER (R.). *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 1951, **93**, 275.
 BRAUN (W.) et BONESTELL (A. E.). *Am. J. vet. Res.*, 1947, **8**, 386.
 BRAUN (W.) et OGLESBY (G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **86**, 757.

- BRUCE (D.). *Practitioner*, 1887, **39**, 161.
- BRUCE (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1893, **7**, 289.
- BUDDLE (M. B.). *J. Hyg.*, 1956, **54**, 351.
- BUDDLE (M. B.) et BOYES (B. W.). *Austral. vet. J.*, 1953, **29**, 145.
- BUNNEL (D.). [*Comm. personnelle*] 1955.
- BURGISSER (H.). *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 1949, **91**, 273.
- BURGISSER (H.). *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 1955, **97**, 548.
- BURNET (Et.). *Arch. Inst. Pasteur Afrique du Nord*, 1923, **3**, 48.
- CAMERON (H. S.) et MEYER (M. E.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 34.
- CARRÈRE (L.), ROUX (J.) et MANDIN (J.). *O. M. S./Bruc., Série d'Informations*, septembre 1957, n° 162.
- CRUICKSHANK (J. C.). *J. Hyg.*, 1954, **52**, 105.
- DAMBOVICEANU (A.), BARBER (C.), POP (A.) et MARINOV (I.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 736.
- DI AICHELBURG (U.). *Soc. internat. Microbiol., Sez. Ital.*, 1935, **7**, 17.
- DOUBROVSKAIA (I. I.). *Biokhimiya*, 1951, **16**, 41 et 1954, **19**, 137.
- EVANS (A. C.). *J. inf. Dis.*, 1918, **22**, 580.
- EVANS (A. C.). *J. inf. Dis.*, 1918, **23**, 354.
- EVANS (A. C.). *Publ. Hlth. Rep.*, 1923, **38**, 1943.
- EVANS (A. C.). *Hyg. Lab. Bull.*, 1925, **27**, n° 143.
- FEUSIER (M. L.) et MEYER (K. F.). *J. inf. Dis.*, 1920, **27**, 185.
- FOSTER (J. W.). *Proc. Virginia Acad. Sci.*, 1950, 29.
- GARGANI (G.) et DONNINI (M. V.). *Nuovi Ann. Microbiol.*, 1953, **4**, 268.
- GARGANI (G.) et DONNINI (M. V.). *Boll. Ist. sier. milan.*, 1954, **33**, 274.
- GARGANI (G.), BENELLI (S.) et GUERRA (M.). *Boll. Ist. sier. milan.*, 1957, **36**, 41.
- GERHARDT (P.), LEVINE (H. B.) et WILSON (J. B.). *J. Bact.*, 1950, **60**, 459.
- HENRY (B. S.). *J. inf. Dis.*, 1933, **52**, 399.
- HERSHEY (A. D.), HUDDLESON (I. F.) et PENNEL (R. B.). *J. inf. Dis.*, 1935, **57**, 183.
- HUDDLESON (I. F.). *Cornell Vet.*, 1921, **11**, 210.
- HUDDLESON (I. F.). *Mich. Agr. Exp. St., Techn. Bull.*, 1929, n° 100.
- HUDDLESON (I. F.). *Mich. Agr. Exp. St., Techn. Bull.*, 1940, n° 177.
- HUDDLESON (I. F.). *Mich. Agr. Exp. St.*, 1952, 7.
- HUDDLESON (I. F.) et ABELL (E.). *J. Bact.*, 1927, **13**, 130.
- HUDDLESON (I. F.) et ABELL (E.). *J. inf. Dis.*, 1928, **43**, 81.
- HUDDLESON (I. F.) et WHITE (E. A.). *M. S. C. Vet.*, 1954, **14**, 120.
- HUGHES (M. L.). *Mediterranean, Malla or Undulant Fever*, Londres, Mac Millan et C^{ie}, 1897.
- HUSTON (R. C.), HUDDLESON (I. F.) et HERSHEY (A. D.). *Mich. Agr. Exp. St., Techn. Bull.*, 1934, n° 137.
- JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). a) *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 99 ; b) *Idib.*, 1951, **80**, 214 ; c) *Bull. Acad. Méd.*, 1951, **135**, 430 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 218.
- LEVI (M. L.), NEEMAN (L.) et DAFNI (I.). *Refuah Vet.*, 1952, **9**, 74.
- LISBONNE (M.) et MONNIER (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 1114.
- LISBONNE (M.), NÈGRE (L.), SEIGNEURIN (R.) et ROMAN (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **61**, 822.
- LURIA (S. E.). *Bact. Rev.*, 1947, **11**, 1.

- MALFATTI (M. G.) et ITHURRALDE (D.). *Semana medica*, 1951, **63**, n° 299.
- MARR (J.) et WILSON (J. B.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **75**, 438.
- MC ALPINE (J. G.) et SLANETZ (C. A.). *J. inf. Dis.*, 1928, **42**, 66.
- MC CULLOUGH (M. B.) et BEAL (G. A.). *J. inf. Dis.*, 1951, **89**, 266.
- MC GOWAN (B.) et SHULTZ (G.). *Cornell Vet.*, 1956, **46**, 277.
- MEYER (K. F.) et SHAW (E. B.). *J. inf. Dis.*, 1920, **27**, 173.
- MICKLES (W. A.). *J. inf. Dis.*, 1940, **66**, 271.
- MILES (A. A.). *Brit. J. exp. Path.*, 1933, **14**, 43.
- MINGLE (C. K.) et MANTHEI (C. A.). *Am. J. vet. Res.*, 1941, **2**, 181.
- MORELLI (E.). *Igiene mod.*, 1954, **47**, 44.
- NEGRI (R.) et VON LORCH (L.). *Zooprofilassi*, 1955, **40**, 3.
- NIZNANSKY (Fr.). *Vet. Casopis*, 1957, **6**, 279.
- NIZNANSKY (Fr.) et KRCMERY (Vl.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1956, **33**, 507.
- NYIREDY (I.). *Acta vet. Acad. Sci. Hung.*, 1954, **4**, 111.
- PARNAS (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 257.
- PENNEL (R. B.) et HUDDLESON (I. F.). *Mich. Agr. exp. St., Techn. Bull.*, 1937, n° 156.
- PICKETT (M. J.) et NELSON (E. L.). *J. Bact.*, 1955, **69**, 333.
- PICKETT (M. J.), NELSON (E. L.) et LIBERMAN (J. D.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 210.
- PLASTRIDGE (W. N.) et MC ALPINE (J. G.). *J. inf. Dis.*, 1930, **47**, 478.
- POLDING (J. B.). *Indian vet. J.*, 1950, **27**, 170.
- POP (A.), DAMBOVICEANU (A.), BARBER (C.) et MARINOV (I.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **427**, 733.
- RENOUX (G.). a) *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 289 ; b) *Ibid.*, 1952, **82**, 556 ; c) *Ibid.*, 1952, **83**, 814 ; *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1957, **34**, 391.
- RENOUX (G.) et AMARASINGHE (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 1948.
- RENOUX (G.) et MAHAFFEY (L. W.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 528.
- RENOUX (G.), CARRÈRE (L.) et QUATREFAGE (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 277.
- RENOUX (G.), SACQUET (E.) et AMARASINGHE (A.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1955, **32**, 375.
- RITA (G.) et DELLA VIDA (B. L.). *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.*, 1951, **2**, 324.
- ROUX (L.) et BOUVIER (G.). *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 1946, **88**, 507.
- SANDERS (E.) et HUDDLESON (I. F.). *Am. J. vet. Res.*, 1950, **11**, 70.
- SCHAFF (A. VAN DEN) et ROSA (M.). *Ned. ind. Bl. Diergeneesk.*, 1940, **52**, 1.
- SILVERMAN (S. J.) et ELBERG (S. S.). *J. Immunol.*, 1950, **65**, 163.
- STABLEFORTH (A. W.). *O. M. S./Bruc.*, *Série d'Informations*, septembre 1952, n° 56.
- STALH (W. H.), PENNEL (R. B.) et HUDDLESON (I. F.). *Mich. Agr. exp. St., Techn. Bull.*, 1939, n° 168.
- TAYLOR (R. M.), LISBONNE (M.) et ROMAN (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1932, **49**, 284.
- THIELE (H.). *Monatsschr. Veterinärmed.*, 1955, **16**, 364.
- TRAUM (J.). *Ann. Rep. of Chief B. A. I., U. S. Dept. Agr.*, 1914, 30.
- VANDEPITTE (J.) et WIKTOR (T.). *Rev. belge Path. Méd. exp.*, 1951, **21**, 218.

- VANGHELOVICI (M.), DAMBOVICEANU (A.), BARBER (C.) et POP (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 738.
- VEAZIE (L.) et MEYER (K. F.). *J. inf. Dis.*, 1936, **58**, 280.
- WASHKO (F. V.), BAY (W. W.), DONHAM (C. R.) et HUTCHINGS (L. M.). *Am. J. vet. Res.*, 1951, **12**, 320.
- WILSON (G. S.). *J. Hyg.*, 1933, **33**, 516.
- WILSON (G. S.) et MILES (A. A.). *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 1.
- WILSON (D. E.) et EVARS (S. A.). *J. comp. Path. Therap.*, 1936, **49**, 336.
- ZDRODOWSKI (P.), BRENN (A.) et VOSKRESSENSKI (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **45**, 768.
- ZOBELL (C. E.) et MEYER (K. F.). *J. inf. Dis.*, 1932, **51**, 99 et 109.
-

LA NOTION D'ESPÈCE DANS LE GROUPE *SALMONELLA*

par L. LE MINOR.

(Institut Pasteur, Paris)

Les *Salmonella* constituent un des groupes bactériens qui semblent à première vue les mieux connus sous le rapport de leurs propriétés biochimiques et sérologiques. Cependant, toute classification de ce groupe en espèces est sujette à critiques.

Tandis que, selon Huxley [1], les plantes et animaux peuvent être réunis en unités naturelles qui se distinguent par la distribution géographique, la morphologie, l'interfécondité et l'incapacité de se croiser avec les groupes voisins, il est impossible d'adopter la même base pour classer les *Salmonella*. Si chez certaines souches d'*E. coli* des phénomènes de sexualité ont été démontrés, à notre connaissance aucune observation analogue n'a été faite chez les *Salmonella*. Et si, dans ce groupe, des croisements peuvent se produire, il nous faudrait non pas quelques observations isolées, mais une multitude d'observations pour aboutir à une classification basée sur l'interfécondité à l'intérieur des « espèces » qui composeraient ce groupe.

Une classification pourrait éventuellement être basée sur la transduction ou la transformation, c'est-à-dire sur la capacité d'échanger des déterminants génétiques, soit par l'intermédiaire des bactériophages, soit directement. Nous possédons pour la transduction des résultats intéressants. Mais ils ne portent que sur un nombre relativement très limité de sérotypes.

Les méthodes génétiques ne nous ont pas jusqu'à présent apporté d'informations suffisantes pour baser sur elles une classification.

Les seules classifications actuellement possibles reposeront donc sur les caractères qu'utilisent les bactériologistes pour identifier les *Enterobacteriaceae*. Or leurs méthodes doivent être rapides et relativement simples. Leur but essentiel est de fournir rapidement un diagnostic en raison des conséquences thérapeutiques et épidémiologiques qu'il comporte.

Ces caractères sont les suivants : morphologiques, biochimiques, sérologiques.

La seule différence morphologique éventuellement utilisable est

la présence ou l'absence des flagelles. Si les *Salmonella gallinarum-pullorum* sont constamment immobiles, nous connaissons aussi de nombreuses variantes immobiles, sans flagelles de souches de *Salmonella* normalement mobiles.

Les expériences sur la transduction de Lederberg et Edwards [2], de Stocker, Zinder et Lederberg [3] ont montré que la mobilité était un caractère complexe dû à trois groupes de gènes. Au moins sept gènes distincts sont impliqués dans la formation des flagelles, deux autres dans la fonction locomotrice (on connaît des variantes flagellées immobiles, « paralysées »), tandis que les déterminants antigéniques forment un troisième groupe. Un bactériophage cultivé sur une variante non flagellée et mis en contact avec une autre souche non flagellée est capable de rendre celle-ci flagellée, mobile, avec une spécificité H. Il manquait à la souche réceptrice un déterminant génétique que possédait la première. En faisant de telles expériences de transduction avec *S. gallinarum-pullorum* comme souche donatrice, Lederberg et Edwards [2] ont observé chez *S. sendai* (9,12 : a) employée comme souche réceptrice, l'apparition d'antigène gm, identique à celui trouvé normalement chez *S. enteritidis*.

Nous ne pouvons donc baser une classification sur la morphologie.

Les épreuves biochimiques que nous employons sont pour la plupart grossières. Il ne s'agit pas de dénier leur valeur pour le diagnostic pratique et rapide des *Enterobacteriaceae*, car c'est sur leur base qu'a été établie une classification dont l'intérêt médical et vétérinaire est indiscutable. Mais quand nous disons qu'un glucide est fermenté parce que nous avons observé un virage de l'indicateur de pH, nous ne savons pas par quelle voie métabolique il l'a été. Deux bactéries qui, placées dans des conditions identiques, font fermenter un même glucide, c'est-à-dire qui donnent une même réaction positive, peuvent métaboliser ce glucide par des voies différentes.

Certaines des réactions que nous utilisons couramment tirent leur intérêt de leur faible sensibilité : recherche de l'HS, de l'acétyl-méthyl-carbinol.

Une évolution se dessine cependant vers l'utilisation de méthodes plus précises que l'observation des modifications de pH des milieux additionnés de glucides : le milieu au KCN de Braun, les méthodes de recherche des décarboxylases et des désaminases de certains amino-acides par exemple, sont entrés dans la routine.

Parmi les sérotypes de *Salmonella* actuellement connus, seul *S. typhi* présente des caractères biochimiques permettant en général de la distinguer des autres : elle ne donne jamais de gaz (mais il existe des variantes agazogènes de *Salmonella* gazogènes) ; elle est en général xylose positive et arabinose négative

(cependant les types X— et A—, X+ et A+, le premier surtout, ne sont pas rares) et elle ne peut se multiplier sur milieu synthétique que si ce dernier est additionné de cystine et de tryptophane ou d'indole. La plupart des *Salmonella*, au contraire, à part *S. paratyphi* A et *S. sendai* semblent (nous ne pensons pas que des recherches systématiques aient été faites dans ce sens pour tous les sérotypes) cultiver sur milieu synthétique sans aminoacides. Une classification trop hâtive, basée sur un caractère biochimique qui momentanément paraît le plus important, peut conduire à des erreurs. Ainsi pendant un certain temps les *Arizona*, quoique très proches des *Salmonella* par leurs caractères biochimiques et antigéniques, avaient été classés dans les *paracolobactrum* uniquement parce qu'elles font virer tardivement les milieux lactosés.

Si les caractères biochimiques nous permettent de faire le diagnostic de *Salmonella* et de subdiviser les types sérologiques en types biochimiques, ils ne nous permettent pas de reconnaître dans ce groupe ce qui pourrait correspondre à des espèces.

Les propriétés sérologiques bien étudiées chez les *Salmonella*, contrairement à d'autres groupes comme les *Cloaca* ou *Retigrella*, ont permis une subdivision très poussée : l'intérêt du schéma de Kauffmann-White [5] est indiscutable.

Les antigènes somatiques ont permis de subdiviser les *Salmonella* en « groupes O » ayant un facteur commun, caractéristique de ce groupe : 4 pour le groupe B, 9 pour le groupe D, etc. Chacun de ces groupes comprend divers sérotypes qui, à côté de ce facteur O spécifique du groupe peuvent en posséder un ou plusieurs autres (par exemple dans le groupe B certaines souches possèdent 1,4,5,12, d'autres 4,12,27, etc.) et un ou plusieurs antigènes flagellaires. Ces antigènes H peuvent être présents dans de nombreux sérotypes appartenant à des groupes O différents.

Les antigènes somatiques de chaque groupe O ont incontestablement une grande stabilité. Cependant on a pu, au moyen d'immunsérum, obtenir expérimentalement des variations telles que 6,7 $\rightarrow$ 6,8 ; 3,10 $\rightarrow$ 3,15 ; 1,3,19 $\rightarrow$ 3,15 $\rightarrow$ 3,10. Mais jusqu'à présent on n'a pas pu passer d'un antigène somatique spécifique d'un groupe O à un autre. Sous l'action d'immunsérum on peut au contraire transformer facilement un antigène H en un autre sérologiquement complètement différent et même faire apparaître des phases nouvelles telles que l'antigène j de *S. typhi* ou z5 de *S. schleissheim*. Et la transduction a permis d'obtenir des hybrides qui, quoique conservant tous les autres caractères de la souche originelle, ont un antigène H particulier venant de la souche donatrice.

En se basant sur la sérologie seule, on pourrait donc admettre,

comme le suggère Cioglia [4], que les *Salmonella* sont composées de différentes espèces correspondant chacune à un groupe O du tableau de Kauffmann-White. Il y aurait ainsi 32 espèces différentes, subdivisées par leurs antigènes H et éventuellement Vi en variantes de l'espèce, elles-mêmes divisées en types biochimiques et bactériophagiques.

Une telle classification pourrait être acceptable, puisqu'elle utilise le tableau de Kauffmann-White universellement admis. Il est cependant peu satisfaisant de réunir dans une même espèce *S. typhi*, *S. dublin* et *S. gallinarum pullorum* qui ont un pouvoir pathogène et des exigences nutritives aussi différentes.

Si la classification est essentielle pour le travail du bactériologiste qui a des diagnostics à établir, une unité dans la nomenclature l'est aussi pour éviter une confusion totale (rappelons que le bacille d'Eberth a été successivement appelé *Bacillus typhosus*, *Bacterium typhosum*, *Eberthella typhosa*, *Salmonella typhi*). C'est ce que recherchent les taxonomistes comme Cowan, qui sont à juste titre choqués par le fait que les bactériologistes des *Enterobacteriaceae* désignent les *Arizona* par leur formule antigénique et les *Salmonella* par deux noms latins.

Avons-nous le droit de considérer chaque sérotype de *Salmonella* comme une espèce définie si dans d'autres groupes comme chez les *E. coli* nous considérons les sérotypes comme des variantes d'un type unique ? Or un *E. coli* 111:B4:H12 est aussi différent d'un 111:B4:H2 qu'une *Salmonella cholerae* suis (6,7:c:1,5) d'une *Salmonella bareilly* (6,7:y:1,5).

Si l'on adopte une classification sérologique, doit-on appliquer le terme d'espèce aux *Salmonelleae* (comprenant *Salmonella* et *Arizona*), aux *Salmonella*, aux souches ayant un antigène O caractéristique du groupe sérologique, ou au type sérologique déterminé par ses antigènes O, H et éventuellement Vi ? Actuellement deux tendances s'affrontent : celle d'un « puriste de la taxonomie », Cowan, et celle du Sous-Comité des *Enterobacteriaceae*.

Cowan [6] estime que les bactéries peuvent être classées en genres et espèces, mais que ces dernières n'ont pas de caractères fixes et que la variation d'un caractère ne doit pas conduire à l'individualisation d'une nouvelle espèce.

En 1956 et 1957 [7, 8], se basant sur le fait qu'un groupe comme les *Salmonella* a un rang équivalent à un genre et les subdivisions à un rang soit d'espèces, soit de sérotypes, il propose deux schémas : le premier qui est un compromis quant à la nomenclature est destiné à la bactériologie appliquée, et utilise des noms vulgaires, bien que certains de ces noms ressemblent à la dénomination binominale de Linné. Les *Salmonella* compren-

draient *S. typhi* (bacille typhique), *S. cholerae suis* (bacille du hog cholera), *S. typhi murium* (bacille de la typhoïde des rongeurs), *Salmonella* London... Le second schéma, systématique, comprendrait *Salmonella typhi*, *S. cholerae suis*, *S. kauffmannii* var. *typhi murium*, *S. kauffmannii* var. London.

Une autre opinion est celle de la majorité des membres du Sous-Comité des *Enterobacteriaceae*. A la suite de l'article de Cowan sur la philosophie de la classification [9], deux questions ont été posées aux membres de ce Sous-Comité. « La structure hiérarchique d'un système de Linné satisfait-elle aux exigences des microbiologistes ? Pouvons-nous accepter le concept d'espèce et tout ce que celui-ci implique ou devons-nous envisager les bactéries comme constituant un large spectre composé de formes s'estompant graduellement ? » Kauffmann, Edwards et Ewing [10] ont répondu nettement à ces questions, et nous partageons leur opinion, bien que Sneath [11] la qualifie de pessimiste : « Ni le système linnéen, ni le concept d'espèce au sens linnéen ne peuvent être utilisés. Et puisque nous ne connaissons ni les relations génétiques, ni les tendances de l'évolution dans la famille, il est impossible de dire si une classification donnée est scientifiquement correcte, mais seulement si elle est plus ou moins pratique et utile. Pour éviter d'interminables discussions sur la question de savoir si le groupe *Salmonella* doit être regardé comme un genre ou une espèce, il est préférable d'abandonner la classification arbitraire en genres et espèces et de subdiviser les *Enterobacteriaceae* en groupes, sous-groupes et types, comme l'a proposé le Sous-Comité des *Enterobacteriaceae*. »

En effet, nous ne pensons pas que, dans l'état actuel de nos connaissances, on puisse employer chez les *Salmonella* subdivisées dans une intention diagnostique d'après leurs propriétés biochimiques et antigéniques, un système analogue à celui que les botanistes et les zoologistes ont établi pour les plantes et les animaux supérieurs en se fondant sur des caractères totalement différents. De même que les caractères enzymatiques, les caractères antigéniques ont des déterminants génétiques. Il nous semble que seule une meilleure connaissance de la génétique des *Salmonella* permettra d'établir une classification naturelle.

SUMMARY

THE NOTION OF SPECIES IN THE *Salmonella* GROUP.

No sufficient information has until now been provided by genetics to establish a classification of *Enterobacteriaceae* and we are obliged to turn to the properties used by bacteriologists to identify them.

1° Morphology. It is impossible to base a classification on the difference between mobile and immobile forms: there are immobile variants of normally mobile forms, and by transduction, it is possible to transform bacteria deprived of flagella into mobile and flagellate bacteria.

2° Biochemical properties are too uniform to be of any use. Gas production is not a quite stable character. Nutritional requirements are not sufficiently known.

3° The antigenic characters allow the most satisfactory classification to day. The usefulness of the Kauffmann-White's scheme is not questionable, but we cannot say whether the word « species » should be applied to *Salmonellae*, to O groups of the antigenic scheme, or to serotypes.

In such conditions it is preferable to adopt the decision of the Sub-Committee, which proposes to subdivide *Enterobacteriaceae* into groups, sub-groups and types. Only a better knowledge of *Salmonella* genetics will allow to establish a natural classification.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HUXLEY (J.). *The new systematics*, Clarendon Press, Oxford, 1940.
- [2] LEDERBERG (J.) et EDWARDS (P. R.). *J. Immunol.*, 1953, **71**, 232.
- [3] STOCKER (B. A. D.), ZINDER (N. D.) et LEDERBERG (J.). *J. gen. Microbiol.*, 1953, **9**, 410.
- [4] CIOGLIA (L.). *Filogenesi e taxonomia delle Enterobacteriaceae*. Istituto di Igiene della Università di Cagliari, édit., 1957.
- [5] KAUFFMANN (F.). *Ergeb. Mikrob.*, 1957, **30**, 160.
- [6] COWAN (S. T.). *J. Path. Bact.*, 1957, **73**, 312.
- [7] COWAN (S. T.). *J. gen. Microbiol.*, 1956, **15**, 345.
- [8] COWAN (S. T.). *Bull. Hyg.*, 1957, **32**, 101.
- [9] COWAN (S. T.). *J. gen. Microbiol.*, 1955, **12**, 314.
- [10] KAUFFMANN (F.), EDWARDS (P. R.) et EWING (W. H.). *Int. Bull. Bact. Nom. Tax.*, 1956, **6**, 29.
- [11] SNEATH (P. H. A.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **17**, 184.

LA NOTION D'ESPÈCE DANS LE GROUPE *SHIGELLA*

par P. THIBAUT.

(Service de Microbie Technique, Institut Pasteur, Paris)

Au cours des réunions de Montevideo et de Rome, le Sous-Comité des *Enterobacteriaceae* [1, 2] a défini, par un ensemble de caractères, le groupe *Shigella* et a élaboré la classification utilisée actuellement. Il s'était fixé un but essentiellement utilitaire et les rédacteurs des rapports ont évité avec soin les mots tribu, genre, espèce. Kauffmann, Edwards et Ewing [3] ont justifié cette attitude par l'impossibilité d'accepter le concept d'espèce dans le sens linnéen. Ils expliquent que la famille des *Enterobacteriaceae* « est composée d'un grand nombre de types bactériens, apparentés entre eux, qui présentent presque toutes les combinaisons concevables des caractères biochimiques compatibles avec la définition de la famille. Ces types forment une série si continue qu'il est difficile de la diviser en groupes distincts ».

Le schéma, finalement adopté, repose sur des caractères biochimiques et antigéniques. Il distingue dans le « groupe » *Shigella* 4 « sous-groupes » formés de « types » distinguables par la sérologie.

Le sous-groupe A, *Sh. dysenteriae*, est constitué de sérotypes qui, à l'image du bacille de Shiga devenu *Sh. dysenteriae* 1, n'attaquent pas le mannitol.

Le sous-groupe B, *Sh. flexneri*, comprend des sérotypes qui habituellement, produisent de l'acide aux dépens du mannitol. Ils sont tous apparentés par des relations sérologiques qu'ils doivent à l'existence d'un « antigène de groupe », mais des « antigènes de type », particuliers à chacun d'eux, permettent de les identifier.

Le sous-groupe C, *Sh. boydii*, renferme des sérotypes qui ont des caractères biochimiques semblables à ceux des sérotypes *Sh. flexneri*, mais ils n'ont avec eux aucun rapport antigénique important.

Le sous-groupe D contient seulement *Sh. sonnei*. Cette bactérie ressemble, par ses caractères biochimiques, aux membres des groupes B et C, mais elle attaque aussi, bien que tardivement, le lactose.

On voit que la nouvelle classification a respecté certaines appellations traditionnelles et binominales, mais ces appellations n'ont pas la prétention de désigner des espèces : l'intrication des caractères, les limites indécises de chacun des sous-groupes n'auto-risent pas cette illusion.

La fermentation du mannitol, utilisée comme clé d'identification depuis plus de cinquante ans, n'est pas un critère absolu. S'il est tout à fait exceptionnel d'isoler une souche du sous-groupe A qui attaque le mannitol [4], il n'est pas rare de rencontrer des cultures de *Sh. flexneri* inactifs vis-à-vis de cet alcool ; de tels variants sont particulièrement fréquents dans les sérotypes 4 a et 6, mais on en a signalé dans tous les sérotypes. On en trouve aussi quelquefois dans le sous-groupe *Sh. boydii*. Ces microbes se présentent alors, biochimiquement, comme des membres du sous-groupe A.

De même, la fermentation du lactose est le caractère biochimique important qui distingue *Sh. sonnei* des autres *Shigella* mannitol-positives. Mais l'utilisation du lactose est tardive ; elle réclame, pour se produire, plusieurs jours ou plusieurs semaines et peut faire défaut au cours de cinq ou six semaines d'observation. Les souches lactose-négatives, signalées par certains auteurs comme une rareté, représentent, comme l'ont vu M^{mes} Rubinsten et Piéchaud [5, 6], la très grande majorité des souches isolées depuis quelques années en France, tout au moins dans la région parisienne. *Sh. sonnei* ressemble alors, par ses caractères biochimiques, à *Sh. flexneri* ou à *Sh. boydii*. Son diagnostic repose essentiellement sur l'étude sérologique et les indications qu'elle fournit peuvent elles-mêmes, en certains cas, s'avérer peu efficaces.

Les cultures de *Sh. sonnei* subissent, de façon habituelle et souvent rapide, une variation antigénique de la forme I à la forme II, sérologiquement distinctes l'une de l'autre. Il arrive même qu'on isole directement du malade une souche en forme II. Sa structure est alors si voisine de celle de *Sh. boydii* 6 que certains assurent qu'elle lui est identique [4, 7] ; les divergences d'opinions sur ce sujet peuvent d'ailleurs tenir au matériel étudié. La distinction entre une culture de *Sh. sonnei*, lactose-négative, en forme II, et une culture de *Sh. boydii* 6 peut donner lieu à des discussions sur la valeur de caractères mineurs ; elle n'entraîne pas la conviction.

Dans la plupart des cas, pourtant, la sérologie, confirmée par quelques caractères culturels ou biochimiques, permet de classer, de façon satisfaisante, une souche de *Shigella* à la place qui lui revient dans l'un des sous-groupes. Mais ces sous-groupes peuvent-ils être considérés comme des équivalents de ce qu'on

a coutume d'appeler des « espèces » ? Dans d'autres groupes bactériens, une différence de structure antigénique n'implique pas des espèces distinctes ; beaucoup d'espèces sont sérologiquement hétérogènes. Cependant, le diagnostic entre *Sh. flexneri* et *Sh. boydii* est uniquement basé sur la présence ou l'absence de certains antigènes. Cowan [8] exprime l'opinion qu'il serait probablement plus systématique de les rassembler sous un même titre et de reconnaître simplement deux variétés de *Sh. flexneri*. Les tentatives faites précédemment dans le même sens par d'autres auteurs n'ont pas reçu un accueil favorable.

Si les frontières qu'on peut tracer entre les sous-groupes n'ont pas la rigidité qui conviendrait pour définir des espèces, il est plus significatif encore de constater que les limites du groupe *Shigella* lui-même sont purement conventionnelles et que plusieurs auteurs en discutent encore.

Les cultures naguère étiquetées *Sh. alkalescens* et *Sh. dispar*, suivant qu'elles n'utilisent pas le lactose ou qu'elles l'attaquent tardivement, ont été écartées du groupe *Shigella*. Kauffman [9, 10] les regarde comme des souches *E. coli* immobiles et anaérogènes : nombre d'entre elles ont les mêmes antigènes O et K que les souches typiques d'*Escherichia* et leur pouvoir pathogène est probablement de même ordre : on les trouve chez des individus normaux, dans des cas d'entérite et dans des infections urinaires. Le Sous-Comité les a placées dans un groupe particulier : *Alkalescens-Dispar*.

Cowan accepte les vues de Kauffmann et, logiquement, propose un sous-groupe, *Escherichia alkalescens*. Ce nom a l'avantage, que beaucoup sans doute apprécieront, d'une apparente correction. Il a l'inconvénient de masquer une position d'attente et de donner l'impression que ces bactéries, réunies pour des raisons de commodité, forment une espèce.

Cowan regrette cependant que le bacille de Sonne se trouve séparé de son pendant biochimique, indologène, *Bacillus dispar*. Pour les rapprocher, il inclurait volontiers le bacille de Sonne dans le groupe *Escherichia*. Ce bacille n'a pas de relations sérologiques avec les divers groupes O d'*E. coli*, mais on connaît l'existence de bactéries mobiles, coliformes, dont l'antigène O est identique à celui de *Sh. sonnei*. Cet argument est faible ou bien il justifierait le rattachement du groupe *Shigella* entier au groupe *Escherichia*. Les relations qui unissent ces deux groupes sont nombreuses et étroites ; d'après Ewing [41], les sérotypes de *Shigella*, dont les antigènes O n'ont pas de parenté avec les antigènes des groupes 01 à 130 d'*E. coli*, sont très rares, et, dans plusieurs cas, les relations qui existent proviennent d'une identité complète.

L'attitude de Cioglia [12] diffère complètement de celle de Cowan, mais elle relève d'une gêne identique devant la même situation. Il voudrait lui aussi rapprocher les bacilles de Sonne et *dispar*. Pour cela, il envisage de les inclure ensemble dans le groupe *Shigella*. Il estime que les propriétés métaboliques des souches A-D sont plus voisines de celles des *Shigella* que de celles d'*E. coli*, puisque le seul caractère anormal est la fermentation de la salicine par quelques cultures. Quant à leur structure antigénique, si elle se rapproche davantage, par ses antigènes thermolabiles, de celle d'*E. coli*, elle s'apparente aussi, par ses antigènes O, au groupe *Shigella*. Tout en admettant que le pouvoir pathogène plus élevé, que la fréquence plus grande des isollements de *Sh. sonnei* peuvent, en pratique, justifier pour ce bacille une position particulière, l'auteur italien propose d'intégrer dans le sous-groupe D, à la suite de *Sh. sonnei*, les sérotypes *alkalescens-dispar*.

On peut, pour des raisons de commodité ou même de sentiment, préférer telle ou telle façon de diviser le groupe *Shigella* mais, pourvu que soient respectés un certain ordre et certaines affinités, on ne peut juger absurdes les arguments de ceux qui prétendent effectuer le partage en un point plutôt qu'en un autre. Il en serait autrement si les unités ainsi formées correspondaient à des entités naturelles. L'harmonie du schéma actuel tient dans la progression d'activité biochimique des divers groupements, mais on peut concevoir l'introduction de réactions qui bouleverseraient les rapports établis.

Une nomenclature toute nouvelle pourra naître des progrès de la bactériologie. En attendant, la tâche des systématiciens est de perfectionner celle qui existe. Ses cadres sont trop rigides pour contenir les formes de transition, mais ils ont rendu et rendent encore de très grands services. Résumer en deux mots, sous une forme compréhensible, l'essentiel d'une étude souvent fort longue, n'est pas un mince avantage. On peut discuter si l'unité fondamentale de la classification mérite encore le nom d'espèce. Il y a déjà longtemps que les mots genre, espèce, ont pris en bactériologie un sens conventionnel qui exprime des degrés dans la hiérarchie systématique. Ces mots, comme beaucoup d'autres, ont, en vieillissant, perdu leur vertu originelle. Il suffit d'en prendre conscience et d'attendre une terminologie meilleure, avant de les rejeter avec horreur. La taxonomie n'est pas une science d'avant-garde. Toute modification de la classification exige de la prudence. Elle doit tenir compte de la tradition, intervenir avec un certain retard et se justifier par l'acquisition de connaissances solidement établies. Il ne faut pas que le souci d'ordre devienne un facteur de confusion.

SUMMARY

THE NOTION OF SPECIES IN THE *Shigella* GENUS.

The Sub-Committee for *Enterobacteriaceae* has established the classification now used for the *Shigella* group. As it was impossible to admit the concept of species as Linné meant it, the Sub-Committee has avoided the use of the words tribe, genus, species. The *Shigella* group is divided according to the biochemical and antigenic properties into four sub-groups: A) *Sh. dysenteriae*, B) *Sh. flexneri*, C) *Sh. boydii*, D) *Sh. sonnei*, constituted of types which can be differentiated serologically.

Mannitol and lactose fermentation used as key of identification are not absolute criteria. Sub-group B strains which do not attack mannitol are not rare and are then biochemically similar to sub-group A strains. *Sh. sonnei* strains which do not attack lactose are often found in France and their properties are analogous to that of *Sh. flexneri* or *boydii*. The distinction between the form II of *Sh. sonnei* and *Sh. boydii* 6 is questionable.

Even the limits of the *Shigella* group are doubtful. Some authors propose to include *Sh. sonnei* in the *Escherichia* group; other ones prefer to include the A-D serotypes in the *Shigella* group. The reasons set forth are not absurd; they would be absurd should the linnaean species exist.

The progress of bacteriology will probably allow to establish a new nomenclature. For the time being, it is not desirable that it should undergo too rapid changes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Report. The Enterobacteriaceae Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Association of Microbiologists. Reports of the Enterobacteriaceae Subcommittee on the groups *Salmonella*, *Shigella*, *Arizona*, *Bethesda*, *Ballerup*, *Escherichia*, *Alkalescens-Dispar*, *Klebsiella*, and *Proteus* in Rio de Janeiro, August 1950. *Int. Bull. Bact. Nom. Tax.*, 1954, 4, 1.
- [2] Report. The Enterobacteriaceae Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Association of Microbiologists. Reports of the groups: *Salmonella*, *Shigella*, *Arizona*, *Bethesda*, *Escherichia*, *Klebsiella* (*Aerogenes*, *Aerobacter*), *Providencia* (29911 of Stuart et coll.). *Int. Bull. Bact. Nom. Tax.*, 1954, 4, 47.
- [3] KAUFFMANN (F.), EDWARDS (P. R.) et EWING (W. H.). *Int. Bull. Bact. Nom. Tax.*, 1956, 6, 29.

- [4] EDWARDS (P. R.) et EWING (W. H.). *Identification of Enterobacteriaceae*. Burgess Publish. Co., Minneapolis, 1955.
 - [5] RUBINSTEN (S.) et PIÉCHAUD (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 770.
 - [6] SZTUM-RUBINSTEN (S.) et PIÉCHAUD (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 335.
 - [7] SZTUM-RUBINSTEN (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 342.
 - [8] COWAN (S. T.). *J. gen. Microbiol.*, 1956, **15**, 345.
 - [9] KAUFFMANN (F.). *Acta Path.*, 1949, **26**, 879.
 - [10] KAUFFMANN (F.). *Enterobacteriaceae*, 2^e éd., Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1954.
 - [11] EWING (W. H.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 333.
 - [12] CIOGLIA (L.). *Filogenesi e tassonomia delle Enterobacteriaceae*. Soc. Edit. Italiana, Cagliari, 1957.
-

M. **Prévo**t prépare en quelques mots la discussion des rapports.

« Il semble bien, d'après les rapports de M. Lwoff et de M. Schaeffer, que la notion d'espèce bactérienne — dont chacun sait qu'elle est arrivée à un tournant de son histoire — doit subir ses plus rudes assauts de la part des généticiens. Mais c'est aussi des généticiens qu'elle recevra les appuis les plus solides pour son orientation dans le proche avenir, puisque par le truchement de la transformation, de la conversion, de la conjugaison et de la transduction, on arrivera à connaître mieux les processus de transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre et ainsi, à rapprocher la notion d'espèce bactérienne des notions d'espèces végétales et animales.

M. Lwoff a cité une pensée de l'auteur de *l'Imitation* où il est question de genre et d'espèce. — Ce jalon médiéval nous incite à remonter à la source. Cette notion était déjà en germe à la plus haute époque de la pensée humaine, ce qui explique peut-être sa pérennité. On la trouve en effet exprimée de la façon la plus simple, la plus claire, la plus poétique au premier chapitre de la Genèse, aux onzième et douzième versets (*troisième jour de la création* : espèce végétale).

Onzième verset : « Que la Terre fasse pousser des arbres à fruit produisant, selon leur espèce, du fruit ayant en soi sa semence. »

Douzième verset : « Et la Terre fit sortir du gazon, des herbes portant semence selon leur espèce et des arbres produisant selon leur espèce du fruit ayant en soi sa semence. »

— Quant à l'espèce animale il fallut attendre le quatrième jour pour l'espèce aquatique :

« Que les eaux foisonnent de grands animaux aquatiques et tout être vivant qui se meut foisonnant dans les eaux selon leur espèce et tout volatile ailé selon son espèce. »

— Et le cinquième jour pour l'espèce terrestre :

« Que la Terre fasse sortir des êtres animés, selon leur espèce : des animaux domestiques, des reptiles et des bêtes de la Terre selon leur espèce. »

Il se peut que l'espèce bactérienne autotrophe non pathogène soit impliquée dans la phrase :

« Et tout être vivant qui se meut foisonnant dans les eaux selon leur espèce » (quatrième jour).

Mais pour l'espèce bactérienne pathogène il fallut attendre l'Exode, où elle est impliquée indiscutablement dans la notion de maladie infectieuse au chapitre IX, versets 1 à 7, décrivant les plaies d'Egypte, plus spécialement la 5^e plaie : les pestes du bétail, et aux versets 8 et 10, la 6^e plaie : les pustules malignes.

Si les versets de la Genèse semblent avoir été écrits spécialement pour les Généticiens, ceux de l'Exode semblent avoir été écrits pour les Pasteuriens.

Les pestes du bétail, n'est-ce pas la septicémie des vaches, le choléra des poules, les pestes bovines et porcines, les brucelloses ovines ? Les pustules malignes, n'est-ce pas le charbon ? Et il fallut attendre le merveilleux XIX^e siècle pour qu'un Louis Pasteur en découvre l'étiologie et en invente la prévention.

Le rapport de M. Vendrely nous a montré ce que la biochimie peut apporter d'aide à la construction scientifique de la notion d'espèce bactérienne : tout ce que la biochimie vient d'apporter et tout ce qu'elle apportera encore pour étayer solidement ce concept.

Enfin les rapports des spécialistes des trois groupes parmi les plus étudiés et les plus discutés de la bactériologie : *Brucella*, *Salmonella*, *Shigella*, nous apportent un autre espoir. Après la période de pulvérisation des espèces de ces germes, période angoissante où le bactériologiste se demandait quand s'arrêterait la multiplication des expressions binominales et la valeur exacte des groupes qu'elles couvraient, on assiste maintenant à une simplification rassurante par regroupement des types en unités plus solides et mieux définies que les anciennes espèces.

Ainsi ce colloque nous a apporté, en un raccourci très complet, l'essentiel de ce que nous souhaitions savoir sur la question. »

La discussion est alors ouverte. Y ont pris part : MM. Fасquelte, Grabar, L'Héritier, Raynaud ; M^{lle} Faure, M^{lle} Staub.

★ ★

Les textes des interventions ne nous étant pas parvenus à temps, nous n'avons pas pu les publier.

★ ★

M. Prévot demande à M. L'Héritier de conclure le débat.

M. L'Héritier. — Je suis à la fois très flatté et très embarrassé par la demande que vient de m'adresser M. le Président. Je ne suis pas bactériologiste et n'étais venu ici que pour m'instruire, sans penser un instant que j'aurais à prendre la parole. Puisque je suis mis ainsi au pied du mur, je vais donc tenter de formuler les réflexions que m'ont inspirées les différents exposés que je viens d'entendre.

Il en ressort, semble-t-il, essentiellement, que les bactériolo-

gistes éprouvent les plus grandes difficultés à faire entrer les objets biologiques dont ils s'occupent dans les cadres rigides établis par Linné et dont l'utilisation traditionnelle de la nomenclature binominale a consacré l'usage. Or, ces difficultés ne me surprennent pas, car je reste persuadé que ces cadres ne peuvent s'appliquer à des organismes à reproduction essentiellement clonale comme les bactéries. Ils sont d'ailleurs souvent bien imparfaits, même pour la description des formes plus élevées en organisation et ont dû subir déjà bien des retouches. Ils en subiront d'autres dans l'avenir sans aucun doute, au fur et à mesure que progresseront les connaissances sur la structure des populations.

La systématique, il est banal de le rappeler, poursuit deux buts, parfois d'ailleurs quelque peu contradictoires. L'un d'eux est purement pragmatique ; il s'agit de cataloguer les formes vivantes et de leur donner des noms, avec le seul souci de permettre aux biologistes de s'entendre entre eux. L'autre est par nature plus scientifique ; il s'agit de reconnaître et de décrire la structure même de la déconcertante diversité des formes vivantes. Or, ce second but, les biologistes ne peuvent manifestement plus l'envisager à la manière de Linné, puisque entre lui et eux est intervenue cette révolution fondamentale de la pensée biologique que fut la reconnaissance du fait de l'évolution. Actuellement, c'est nécessairement dans cette optique de l'évolution de la matière vivante que doit se situer toute systématique et cela dans tous les groupes d'organismes. Si les conceptions de Linné et la nomenclature correspondante ont cependant très largement survécu à ce changement fondamental de perspective, c'est en fait parce que, chez la plupart des organismes, l'espèce est beaucoup plus qu'un concept plus ou moins subjectif, elle est une réalité indiscutable. Le jeu normal de l'évolution aboutit à produire des espèces, qui à l'échelle temporelle humaine restent suffisamment stables et séparées les unes des autres pour pouvoir être décrites et cataloguées avec le langage traditionnel. Mais une condition fondamentale pour qu'il en soit ainsi est l'existence de la sexualité et de la reproduction biparentale. M. le Président vient de citer la Genèse en témoignage de l'antiquité de la reconnaissance par l'Homme de l'existence des espèces en tant qu'entités distinctes. J'ajouterai que tout primitif, tout paysan vivant en contact direct avec la nature, ne doute pas un instant de la réalité des espèces. Mais ce primitif sait aussi que les animaux sont mâles et femelles et l'auteur sacré ne l'ignore pas davantage. Quelques versets en effet au-delà du texte cité par M. Prévot, je lis parmi les recommandations adressées à Noé par l'Eternel Dieu : « De tout ce qui vit, de toute chair, tu feras entrer dans l'arche deux de chaque espèce : il y aura un mâle et une

femelle. » C'est donc bien parce que l'expérience courante est limitée aux organismes à reproduction biparentale que la notion d'espèce est si évidente. Il s'agit d'ailleurs très exactement de ce que le paléontologiste américain Simpson désigne sous le nom d'espèce sans dimensions.

A vrai dire, la reproduction biparentale n'est pas une règle absolue chez les organismes élevés en organisation. Il y a des exceptions ; je fais allusion aux cas de parthénogénèse, d'apogamie et d'hermaphroditisme avec autofécondation. Ces types de reproduction ne se rencontrent cependant jamais que d'une manière relativement sporadique et ne constituent la situation régulière dans aucun des grands groupes d'organismes. Il en résulte, semble-t-il, qu'ils correspondent à des impasses évolutives et que leur adoption a toujours été plus ou moins récente. Dès lors, si la notion d'espèce linnéenne et la nomenclature correspondante peuvent encore, *grosso modo*, être utilisées dans la description de ces formes, il peut s'agir là d'une structure systématique relique, que le nouveau mode de reproduction n'a pas encore réussi à effacer complètement.

Chez les bactéries, nous nous trouvons en présence d'une situation toute différente. Il n'y a aucune raison pour supposer qu'elles descendent d'organismes à reproduction sexuée biparentale et leur mode de reproduction normal est purement clonal. Sans doute, des échanges de matériel héréditaire entre clones peuvent se produire et les belles recherches des généticiens de bactéries en ont révélé les mécanismes. Il paraît bien s'agir d'une sorte de sexualité primitive. Ce que nous ignorons cependant totalement, et je pense qu'aucun des généticiens de bactéries ici présents ne me contredira sur ce point, c'est la fréquence avec laquelle ces phénomènes interviennent dans la nature. Il se peut qu'il s'agisse plus ou moins d'artefacts de laboratoire ; cela n'en diminue nullement l'intérêt biologique, mais nous amènerait à penser que les échanges entre clones n'ont joué qu'un rôle nul ou négligeable dans l'évolution des bactéries. Le ressort essentiel de celle-ci serait les phénomènes de sélection à l'intérieur des clones, mécanisme qui, en raison de l'énormité des effectifs des populations, leur permet de s'adapter avec une extrême rapidité à tout changement de milieu. Si telle est la situation, il n'existe véritablement pas d'espèces chez ces organismes, mais seulement des clones dont les propriétés globales ne restent en fait constantes que tant que le milieu ne varie pas. La systématique bactérienne ne peut que se proposer d'établir les relations de filiation entre ces clones. Il sera naturel de rassembler dans une même unité l'ensemble des types qu'il est facile d'obtenir les uns à partir des autres, par exemple par la sélection d'une seule étape mutationnelle. Par contre, lorsque cette dérivation est

impossible ou simplement plus difficile, on peut parler d'unités différentes. Il faut noter cependant que la difficulté de la transformation peut résulter non pas de la rareté ou de la complexité des changements génétiques nécessaires, mais simplement de la difficulté de réaliser un milieu sélectionnant efficacement les mutants correspondants. De toute façon, ces unités ne correspondent que très vaguement aux espèces des organismes à reproduction biparentale et il faudra bien un jour ou l'autre adopter pour les décrire une nouvelle terminologie.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 5 Décembre 1957

Présidence de M. PRÉVOT.

NÉCROLOGIE

EDMOND GRASSET

(1895-1957)

J'ai le triste devoir d'évoquer la disparition d'un membre éminent de notre Société, Pasteurien de formation et de cœur, le professeur E. Grasset, de Genève.

Docteur en médecine de cette Faculté, élève des professeurs Askanazy, Chodat, Christiani, il était fortement préparé pour les disciplines pasteuriennes. Il suivit le grand Cours de l'Institut Pasteur en 1923, et c'est là qu'il rencontra celle qui devait devenir son épouse et fut la compagnie idéale de l'homme de science qu'il fut. D'abord assistant d'A. Calmette, c'est au contact de ce grand maître qu'il commença les recherches dans lesquelles il s'illustra : la tuberculose, le BCG et les venins. Puis il collabora avec G. Ramon et entreprit une série de recherches dans un autre domaine : la fièvre typhoïde. C'est donc à l'Institut Pasteur qu'il devint bactériologiste, sérologiste, épidémiologiste. En 1927, il fut appelé à la tête du service de sérothérapie de l'Afrique du Sud, à Johannesburg, où il resta jusqu'en 1945. C'est là qu'il mit au point l'endotoxoïde tuberculeux qui modifiait favorablement l'évolution sévère de la tuberculose chez les Noirs. C'est là aussi qu'il perfectionna la sérothérapie antivenimeuse par les anavenins formolés, et réussit à produire un sérum polyvalent, aujourd'hui universellement employé. C'est là enfin qu'il réalisa un vaccin très efficace, contre la fièvre typhoïde, en utilisant l'endotoxine typhique.

Ses recherches lui ont valu d'être sollicité par le Gouvernement britannique pour assumer la responsabilité des services de santé de son armée nord-africaine. Après la guerre, il est nommé Directeur de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Genève et Professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine. Il y joua un rôle de premier plan, tant au Comité international de la Croix-Rouge qu'à l'O. M. S., comme expert de la standardisation des sérums, Président du Congrès international de la Poliomyélite, chargé de mission épidémiologique en Indonésie, etc.

Membre de nombreuses sociétés savantes, dont l'Académie Suisse des Sciences médicales, The Royal Society of tropical Medicine and

Hygiène, la Société de Pathologie exotique, le professeur Grasset a publié 169 notes et mémoires. Tous sont d'un intérêt très grand et d'une originalité marquée, tels ses travaux sur l'endotoxine typhique en tant qu'antigène ; la préparation et le titrage des sérums anti-venimeux ; les divers mécanismes de l'immunité, le passage trans-placentaire de la pénicilline, le fractionnement par électrophorèse sur papier du venin de *Vipera russellii* ; propriétés et dosage des facteurs coagulants et anticoagulants de ce venin ; les propriétés anticoagulantes du sulfate de dextrane ; la standardisation des sérums anti-venimeux, l'analyse immunologique des constituants des venins de serpents par la méthode de précipitation en milieu gélifié, et enfin son tout dernier, non encore paru, la micro-réaction pour le diagnostic rapide de la poliomyélite par précipitation sur lame.

Ceux qui ont connu Grasset se rappellent quel charmant collègue il fut : courtois, aimable, dévoué, prévenant. Ce n'est donc pas seulement un savant qui disparaît trop tôt, mais un ami, que nous perdons. C'était aussi un grand ami de la France. Dans la réponse que sa fille le Dr Nicole Grasset m'adressait récemment, elle m'écrivait : « Les mots France et Microbiologie, qui sont inscrits dans le titre de votre Société ont joué dans sa vie un rôle immense et ont été des facteurs de son bonheur. »

Nous adressons à sa famille nos plus vives condoléances et notre sympathie attristée.

A.-R. P.

FÉLICITATIONS AU PROFESSEUR BOVET, PRIX NOBEL

De même que nous nous attristons quand un deuil frappe notre Société, de même nous devons nous réjouir quand une récompense vient consacrer l'œuvre d'un des nôtres. Aujourd'hui il s'agit de la plus haute récompense scientifique, le Prix Nobel, qui vient d'échoir à notre collègue et ami Daniel Bovet, qui est deux fois des nôtres.

Deux fois : d'abord comme pasteurien. C'est en effet dans notre Institut Pasteur, à deux pas d'ici, au Laboratoire de Chimie Thérapeutique, qu'il a fait la grande découverte des antihistaminiques de synthèse ; qu'il a commencé ses recherches sur le curare et les curarisants de synthèse qui lui ont valu ce prix. C'est ici également qu'il a participé à la réalisation de la sulfamidothérapie pour laquelle vous savez le rôle joué par ses amis M. et M^{me} Tréfouël comme chimistes et par son beau-frère Nitti comme bactériologiste.

Tous ici connaissons trop bien son œuvre et il est inutile de la résumer en quelques mots, c'est donc surtout comme membre actif et fidèle de notre Société que je veux vous en parler : il a été parmi les premiers qui l'ont fondée. Quand il était pasteurien, c'était un assidu de nos séances. Nous lui adressons, ainsi qu'à Madame Bovet-Nitti, nos plus chaleureuses félicitations, nous leur disons combien notre Société est heureuse et fière de posséder un Prix Nobel parmi ses membres actifs et nous souhaitons que sa carrière à Rome soit aussi fructueuse que le fut sa carrière à Paris.

A.-R. P.

COMMUNICATIONS

**GLEYIFICATION ET DÉBOISEMENT EN FORÊT DU JURA
INCIDENCES MICROBIOLOGIQUES**

par J. POCHON, G. PLAISANCE et H. DE BARJAC.

(Institut Pasteur.)

Le sujet de la gleyification a été longuement analysé du point de vue pédologique, notamment en forêts du Jura (G. Plaisance, 1953 [1, 2], 1956 [3]). Le massif de la forêt de Chaux est particulièrement intéressant à cet égard, car il s'y associe des limons bruns des pentes non gleyifiés et des limons des plateaux à simili-gley (G. Plaisance, 1953 [4]). Le degré de parenté unissant ces sols pose encore nombre de problèmes liés à leur genèse et à leur évolution. L'un de ces problèmes consiste en leurs propriétés microbiologiques. Dans le but d'étudier ces propriétés, ont été choisis quelques échantillons représentatifs des limons à gley ou sans gley de la forêt de Chaux. De plus, d'autres échantillons ont été sélectionnés en forêt de Chaux et en forêt de Fourg, pour étudier les répercussions microbiologiques éventuelles du déboisement, avec les « vides » à Molinie.

ECHANTILLONS ANALYSÉS.

Trois destinés à la comparaison microbiologique des limons bruns des pentes et des limons à simili-gley :

N° 1 : limon brun des pentes non gleyifié en forêt de Chaux (20 cm).

N° 2 : simili-gley en forêt de Chaux (35-40 cm).

N° 3 : simili-gley de structure encore plus défavorable que le n° 2.

Ces trois échantillons ont été analysés tels qu'ils ont été reçus, c'est-à-dire après stabilisation (par séchage à l'air), leurs pH respectifs étant alors de 4,3 pour le n° 1, de 4,5 pour le n° 2 et de 4,9 pour le n° 3.

Trois autres échantillons destinés à l'analyse microbiologique du déboisement :

N° 4 : trouée à Molinie, en forêt de Chaux (surface).

N° 5 : trouée à Molinie, en taillis sous futaie, en forêt de Fourg.

N° 6 : jeune perchis en amélioration, en forêt de Chaux.

Les pH respectifs de ces échantillons reçus à l'état encore humide ont été trouvés de 4,8 pour le n° 4, de 3,7 pour le n° 5 et de 3,6 pour le n° 6.

RÉSULTATS DES ANALYSES.

Microflore totale. — En germes par gramme de sol : 170 000 pour le n° 1, 120 000 pour les n°s 2 et 3, 12 000 000 pour le n° 4, 15 000 000 pour le n° 5 et 9 500 000 pour le n° 6.

Champignons. — En moyenne du nombre de colonies à la dilution 10^{-2} (sur 3 boîtes) : 1,7 pour les n^{os} 1 et 3, 1 pour le n^o 2, 18 pour le n^o 4, 27 pour le n^o 5 et 31 pour le n^o 6. Formes levures

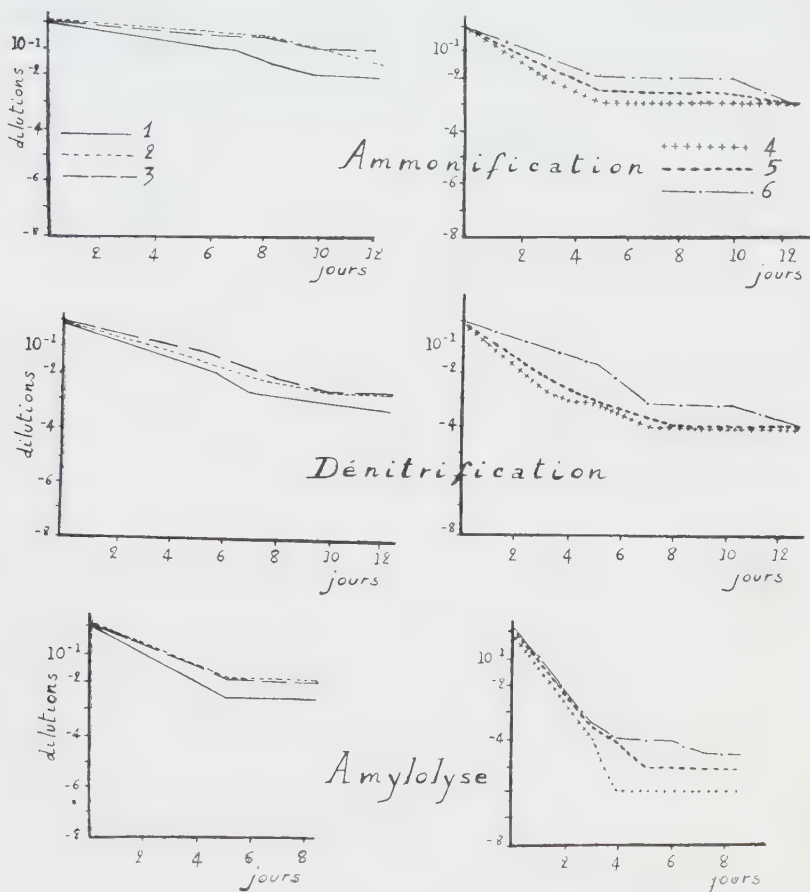


FIG. J. — Courbes d'activité ammonifiante, dénitrifiante et amylolytique des six échantillons testés.

très rares dans les trois premiers échantillons, très nombreuses dans les trois derniers.

Fixation d'azote. — Absence de fixateurs aérobies (*Azotobacter*).

Présence de fixateurs anaérobies (*Clostridium*) : en nombre de tubes positifs par dilution (sur 3 tubes) : à 10^{-1} , 3 pour le n^o 1, 2 pour le n^o 2 et 1 pour le n^o 3 ; à 10^{-2} , 3 pour les n^{os} 4, 5 et 6 ; à 10^{-3} , 2 pour le n^o 4 et 1 pour le n^o 6.

Nitrification. — En dilution positive : $10^{-1,5}$ pour le n° 1, 10^{-1} pour les n°s 2 et 3, 10^{-1} pour les n°s 4 et 6, $10^{-0,5}$ pour le n° 5.

Ammonification, Dénitrification, Amylolyse (Voir courbes, fig. 1).

Cellulolyse. — En aérobiose (sur 3 boîtes) : attaque du papier très lente, manifeste seulement pour le n° 4 au onzième jour. Après un mois, la cellulolyse est forte pour le n° 4 (*Cytophaga*, *Cellvibrio*, Champignons), moyenne pour les n°s 2 (*Cytophaga*) et 5 (*Cytophaga*, Champignons), très faible pour les n°s 3 et 6 (Champignons).

En anaérobiose : en un mois, seuls les n°s 1 et 6 donnent un tube positif sur 6 à 30° (mésophiles).

Sulfato-réduction. — En nombre de tubes positifs par dilution (sur 3 tubes) : à 10^{-1} , 1 pour les n°s 1, 2 et 3 ; à 10^{-2} , 1 pour le n° 2 ; à 10^{-1} , 3 pour le n° 4, 2 pour le n° 5, 1 pour le n° 6 ; à 10^{-2} , 2 pour le n° 5.

Attaque de la méthionine. — En nombre de tubes positifs par dilution (sur 3 tubes) : à 10^{-1} , 1 pour les n°s 1 et 2, 2 pour le n° 3.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

La première série d'échantillons (n°s 1, 2, 3) montre une remarquable homogénéité à l'analyse microbiologique : peu de germes totaux, peu de Champignons, pas d'*Azotobacter* (ce qui n'est point surprenant du fait de l'acidité ambiante), peu d'activité générale (que ce soit pour la fixation anaérobie, l'ammonification, la nitrification, la dénitrification, l'amylolyse ou la cellulolyse). Toutes les fonctions microbiennes testées sont touchées ; il n'en est pas une qui ne témoigne d'un ralentissement considérable. Cependant, il faut, dans ce ralentissement, faire la part de la stabilisation par dessiccation des sols analysés. Sans aucun doute, ce traitement surajoute un freinage général des microorganismes à celui exercé par les propriétés mêmes de ces sols, en particulier par leur acidité. Il serait intéressant de pouvoir répéter les analyses sur les mêmes sols dès leur prélèvement, à leur taux d'humidité naturelle.

A l'intérieur de cette première série telle qu'elle apparaît d'après les examens microbiologiques après stabilisation, se dégagent des différences entre les limons bruns non gleyifiés des pentes d'une part, et les simili-gley d'autre part. Le limon brun est relativement plus actif, microbiologiquement, que les simili-gley : la microflore totale, les *Clostridium*, les ammonifiants, les nitrifiants, les dénitrifiants, les amylolytiques y sont supérieurs. C'est dire que même un traitement par dessiccation, ayant tendance à niveler les activités microbiologiques à leur niveau le plus bas, n'arrive pas à masquer la supériorité relative du limon brun sur les simili-gley. Bien que microbiologiquement parents du limon brun, les simili-gley apparaissent un peu plus pauvres. Leurs caractéristiques les rapprochent des tourbes acides (H. de Barjac, 1955 [5]).

La deuxième série d'échantillons (n°s 4, 5, 6), non soumise au séchage préalable, révèle une activité microbiologique plus forte que celle de la première série, mais qui reste peu développée, si l'on se réfère à l'échelle générale des sols. Cette activité, en effet, est de l'ordre

de celle des mor forestiers (Ph. Duchaufour et J. Pochon, 1955 [6], J. Pochon, 1956 [7]), qui ont d'ailleurs les mêmes propriétés acides.

A l'intérieur de cette deuxième série, les vides à Molinie sont microbiologiquement très voisins, avec une tendance à l'infériorité chez le prélèvement de Fourg, en taillis sous futaie (pour les *Clostridium*, l'ammonification, l'amylolyse, la cellulolyse aérobie). Quant au prélèvement de Chaux, sur jeune perchis en amélioration, il ne montre aucune progression microbiologique par rapport aux trouées à Molinie, au contraire. C'est l'échantillon le plus acide et par conséquent le plus riche en Champignons, mais il apparaît inférieur tant par sa microflore totale que par son pouvoir ammonifiant, dénitrifiant, amylolytique, cellulolytique aérobie et sulforéducteur. L'amélioration signalée sur la végétation n'est pas sensible sur la microflore. On ne peut parler, dans ce cas, d'une régénération microbiologique du sol.

CONCLUSIONS.

L'incidence microbiologique de la gleyification, étudiée sur des limons bruns de la forêt de Chaux, gleyifiés ou non, se marque par un affaiblissement de l'activité. D'autre part, la parenté entre les échantillons étudiés est confirmée par l'analyse microbiologique.

SUMMARY

GLEIFICATION AND DEFORESTATION IN THE JURA FORESTS. MICROBIOLOGICAL INCIDENCES.

The microbiological incidence of gleyification in brown loams of the Chaux forest, gleyified or not, is characterized by a decrease in the activity. On the other hand, the relationship between the samples is confirmed by microbiological analysis.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PLAISANCE (G.). *C. R. Soc. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 2435.
- [2] PLAISANCE (G.). 72^e Sess. Assoc. Fr. Avanc. Sci., juillet 1953.
- [3] PLAISANCE (G.). VI^e Congr. Sci., Sol, Paris, 1956, **5**, 90, 553.
- [4] PLAISANCE (G.). *Revue Forest. Fr.*, 1953, **9**, 565.
- [5] BARJAC (H. DE). *Thèse Doct. Sci.*, Paris, 1955.
- [6] DUCHAUFOUR (Ph.) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 261.
- [7] POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 352.

LES AFFINITÉS TINCTORIALES DES RICKETTSIES ET DES GROS VIRUS VISIBLES

(Groupe lymphogranulomatose-psittacose)

II. — SUR LA SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DE LA COLORATION DE MACCHIAVELLO

par Francis ROGER et Annie ROGER

(présenté par M. GIROUD).

(Institut Pasteur, Service des Rickettsies [D^r Paul GIROUD])

La coloration prise par les rickettsies est susceptible d'une triple interprétation : chimique, anatomique et biologique (*Interprétation chimique* : nature de la substance colorable ; *Interprétation anatomique* : structure colorée ; *Interprétation biologique* : ensemble des propriétés biologiques qui évoluent parallèlement aux affinités tinctoriales.)

On s'est intéressé bien souvent à la signification biologique des procédés usuels de coloration différentielle en microbiologie (colorations de Gram, Ziehl, etc.), mais les tentatives dans le même sens sont demeurées encore peu nombreuses avec la technique différentielle de Macchiavello, véritable coloration de Gram des rickettsies.

Giroud et Panthier, cependant, ont proposé de considérer la Macchiavello-positivité (rickettsies colorées en rouge par la fuchsine) comme un test véritable de vitalité des germes [4]. Cette interprétation ne peut plus être retenue aujourd'hui, depuis que l'on connaît mieux des rickettsies qui se multiplient sous une forme Macchiavello-négative permanente (*R. orientalis*) ou transitoire (*R. prowazeki* et *R. mooseri* sont souvent bleues dans le poumon du lapin). Nous devons donc avouer que nous ne savons encore que peu de chose sur la signification biologique du Macchiavello.

Toutefois, nous croyons qu'il est possible de faire quelques remarques à ce sujet et nous voudrions, pour notre part, résumer les observations que nous avons faites au cours de l'examen de plusieurs milliers de lames, lors de l'étude de plus de 25 souches de rickettsies et de virus du groupe de la psittacose [chacune des souches ayant été observée dans les conditions les plus diverses de culture] (1).

(1) Rappelons tout d'abord, parce que c'est indispensable pour comprendre ce qui suit, que la coloration de Macchiavello ne comporte que deux temps indispensables et que l'aspect des éléments colorés ne dépend que de leur affinité préférentielle pour la fuchsine ou le bleu de méthylène. Ainsi, les éléments Macchiavello-positifs ont une plus grande affinité pour la fuchsine et les éléments Macchiavello-négatifs une plus grande affinité pour le bleu [2].

1° *La coloration de Macchiavello met en évidence des propriétés protoplasmiques tout à fait générales puisque la notion de Macchiavello-positivité ou négativité se retrouve même à l'échelon cellulaire.*

Dans la mesure où l'on utilise, en effet, une différenciation ménagée, les cytoplasmes sont légèrement Macchiavello-positifs et les noyaux sont légèrement Macchiavello-négatifs. Par exemple, si l'on différencie par la fuchsine des cellules colorées au bleu, ce sont les noyaux qui gardent les derniers le bleu de méthylène ; si, à l'inverse (et comme c'est le cas dans le Macchiavello), on différencie par le bleu des cellules colorées par la fuchsine, ce sont les cytoplasmes qui gardent les derniers ce colorant. L'affinité des cytoplasmes des cellules normales est donc plus grande pour la fuchsine ; celle des noyaux est, au contraire, plus intense pour le bleu de méthylène.

2° *L'affinité des éléments virulents (rickettsies ou virus du groupe de la psittacose) pour la fuchsine ou pour le bleu, selon le cas, est toujours beaucoup plus intense que celle des constituants cellulaires : les corpuscules spécifiques conservent, en effet, leur coloration élective (rouge ou bleue) alors même que l'ensemble des cellules (cytoplasmes et noyaux) a acquis la coloration du type opposé.*

On peut donc toujours obtenir les éléments virulents Macchiavello-positifs sur un fond bleu et les éléments Macchiavello-négatifs parmi des cellules colorées en rouge.

3° Certaines rickettsies conservent constamment leur caractère Macchiavello-positif (*R. burneti*, *R. conori*) ou Macchiavello-négatif (*R. orientalis*) au cours de leur développement : *les affinités tinctoriales relatives de ces germes ne semblent donc dépendre que de constantes internes propres.*

4° D'autres microorganismes, au contraire, varient considérablement dans leurs affinités selon le tissu ou l'organe dans lequel on effectue leur culture. C'est le cas de *R. prowazeki* et de *R. mooseri*, ordinairement considérées comme Macchiavello-positives, mais qui sont, cependant, fréquemment Macchiavello-négatives, dans le poumon du lapin ; c'est le cas, aussi, des virus du groupe de la psittacose ; ainsi, le virus de la psittacose lui-même forme surtout des éléments Macchiavello-positifs dans le poumon de la souris et principalement des éléments Macchiavello-négatifs dans le sac allantoïque de l'œuf.

Il est d'ailleurs juste d'ajouter que les virus du groupe de la psittacose sont loin de former un tout du point de vue de leurs affinités tinctoriales, et il y a des variations morphologiques et tinctoriales d'un virus à l'autre (le virus de l'avortement de la brebis a ainsi tendance à former davantage d'éléments Macchiavello-négatifs et le virus de la pneumonie de la souris davantage d'éléments Macchiavello-positifs que le virus de la psittacose).

Avec les germes à colorabilité variable (rickettsies ou virus) la colorabilité préférentielle n'est absolument pas liée à la richesse de la culture (qui peut être aussi grande avec les éléments rouges et avec les éléments bleus) ou à sa rapidité. Elle ne paraît dépendre que de la cellule parasitée : *le contrôle des affinités tinctoriales de ces germes semble donc réalisé non seulement par des facteurs internes, mais encore par des facteurs constitutifs du milieu cellulaire de culture.*

5° Dans le cas où la taille et la morphologie des germes varient aussi

selon les conditions cellulaires de culture, les variations morphologiques d'une part et les variations des affinités tinctoriales d'autre part, ne sont pas corrélatives et paraissent donc dépendre de facteurs cellulaires distincts.

Par exemple, les virus du groupe de la psittacose, pour un même aspect morphologique, celui des corps élémentaires, peuvent former des éléments Macchiavello-positifs dans le poumon de la souris ou des éléments Macchiavello-négatifs dans le sac allantoïque.

Nous voyons donc que si certaines rickettsies paraissent témoigner d'une relative stabilité et comportent une colorabilité relativement indépendante du milieu cellulaire de culture, d'autres rickettsies, au contraire, et bien davantage encore les gros virus, ont un métabolisme profondément influencé par les cellules parasitées.

Dans la mesure où nous pouvons apprécier les variations métaboliques par des tests colorés ou morphologiques, nous pouvons dire que ces variations sont caractérisées par leur intensité, leur dissociation et le peu d'influence qu'elles exercent sur les propriétés biologiques fondamentales des germes étudiés.

a) *Intensité des variations de colorabilité.* — Les affinités tinctoriales d'un même élément peuvent varier dans des limites tellement larges qu'elles rendent les deux aspects du même virus plus différents entre eux que le noyau d'une cellule ne l'est de son cytoplasme.

b) *Dissociation.* — La variation des affinités tinctoriales peut s'observer sans variation morphologique ; la variation morphologique sans variation des affinités tinctoriales.

c) *Faible influence sur les propriétés biologiques fondamentales.* — Celles-ci ne semblent, en effet, aucunement dépendre de la colorabilité : le pouvoir infectant du virus, ses activités reproductrices, son antigénicité ne sont, en effet, aucunement modifiés, quelle que soit la colorabilité au Macchiavello.

Dans ces conditions, il semble donc que l'on soit obligé de conclure assez paradoxalement à l'importance relativement mineure pour le germe de variations métaboliques qu'un procédé de coloration parvient si spectaculairement à démontrer.

SUMMARY

STAINING AFFINITIES OF *Rickettsiae* AND LARGE VIRUSES II. — BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF MACCHIAVELLO STAINING.

The experiments led to the paradoxical conclusion that the metabolic changes demonstrated by Macchiavello staining are not accompanied with very important modifications of fundamental biological properties of the microorganisms.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GIROUD (P.) et PANTHIER (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1941, 253.
- [2] ROGER (F.) et ROGER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 126.

LES AFFINITÉS TINCTORIALES DES RICKETTSIES ET DES GROS VIRUS VISIBLES (Groupe lymphogranulomatose-psittacose)

III. — LA COLORATION DE GIEMSA. SUR SA SIGNIFICATION ANATOMIQUE ET BIOLOGIQUE

par Francis ROGER et Annie ROGER

(présenté par M. GIROUD).

(Institut Pasteur, Service des Rickettsies [D^r Paul GIROUD])

I. MORPHOLOGIE DES GERMES AU GIEMSA. — Lorsqu'on pratique une coloration de Giemsa avec *R. orientalis*, on met en évidence à l'intérieur du germe des granules chromatiques violets (généralement au nombre de deux et affectant une disposition polaire) et une membrane cytoplasmique bleutée, particulièrement bien visible sur les côtés du germe.

Pour d'autres rickettsies et les virus du groupe de la psittacose, on peut aussi retrouver la même structure de base à condition de pratiquer la culture sur des tissus convenablement choisis. Ainsi, *R. prowazeki* et *R. mooseri* se présentent au Giemsa comme des microorganismes bipolaires (très analogues à *R. orientalis*) lors des cultures dans le poumon des rongeurs ; ainsi le virus de l'avortement de la brebis se révèle constitué par une membrane cytoplasmique et par des granules chromatiques après culture sur chorio-allantoïde [4]. Au contraire, pour d'autres milieux cellulaires de culture, la structure de base des rickettsies épidémiques et murines et des virus du groupe de la psittacose peut être masquée au Giemsa par une hypercolorabilité cytoplasmique (qui ne constitue peut-être qu'une simple augmentation de l'affinité tinctoriale de la membrane cytoplasmique). Cette hypercolorabilité (toujours absente avec *R. orientalis*) est la règle quasi constante avec *R. conori* et *R. burneti*, de sorte que les structures internes de ces germes ne sont que rarement visibles (et plus souvent d'ailleurs avec *R. burneti* qu'avec *R. conori*).

Du point de vue anatomique, la coloration de Giemsa permet donc de saisir trois structures distinctes à l'intérieur des rickettsies et des gros virus visibles :

- a) Des granules chromatiques ;
- b) Une membrane cytoplasmique ;
- c) Un substratum hyperchromatique (facultatif mais susceptible, lorsqu'il existe, de masquer les deux autres structures).

La coloration de Giemsa s'oppose donc à celle de Macchiavello, qui confère ordinairement aux mêmes microorganismes un aspect homo-

gène (rouge ou bleu selon que l'élément est Macchiavello-positif ou négatif) et qui ne permet pas de saisir les détails internes de structure.

Aucun des deux procédés de coloration ne met en évidence la *membrane cellulaire* des rickettsies, facilement visible en revanche au microscope électronique.

II. GIEMSA ET IDENTIFICATION DES RICKETTSIES. — Si nous prenons pour critère la présence ou l'absence de l'hypercolorabilité au Giemsa, nous voyons que cette coloration peut être utilisée comme un procédé rapide d'orientation en vue de l'identification des rickettsies, exactement comme le Macchiavello.

Bien plus, les deux procédés se recoupent étroitement, de sorte que la classification en trois groupes que nous avons proposée avec le Macchiavello pour les rickettsies [2] s'adapte très bien au Giemsa :

a) Dans le groupe *Macchiavello-positif*, où les rickettsies sont colorées par la fuchsine, nous trouvons aussi les rickettsies toujours hyperchromatiques au Giemsa : *R. conori* et *R. burneti*.

b) Dans le groupe *Macchiavello-négatif*, les rickettsies, bleues au Macchiavello (*R. orientalis*), sont toujours hypochromatiques au Giemsa (structure interne nettement visible).

c) Dans le groupe *intermédiaire*, on trouve les rickettsies à caractères variables avec l'une ou l'autre des deux colorations (*R. prowazeki* et *R. mooseri* ; virus du groupe de la psittacose). Cependant, il serait faux de conclure que le même substratum cytoplasmique est responsable à la fois de la coloration par la fuchsine et de l'hypercolorabilité au Giemsa, tout élément Macchiavello-positif étant obligatoirement hyperchromatique au Giemsa et tout germe Macchiavello-négatif étant, au contraire, hypochromatique. Si, dans l'ensemble, c'est bien ce que l'on observe avec les rickettsies du groupe intermédiaire (1), la Macchiavello-positivité et l'hypercolorabilité au Giemsa peuvent cependant parfois être dissociées : *R. prowazeki* et *R. mooseri* sont ainsi *Macchiavello-positives* dans le poumon de la souris mais sont alors *hypochromatiques* au Giemsa. Inversement, le virus de l'ornithose, cultivé sur chorio-allantoïde, peut montrer des corps géants (ex-corps initiaux [4]) *Macchiavello-négatifs* mais cependant parfaitement *hyperchromatiques* au Giemsa.

III. SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DE L'HYPERCOLORABILITÉ AU GIEMSA. — L'hyper- et l'hypocolorabilité des rickettsies et des gros virus au Giemsa posent les mêmes problèmes d'interprétation que la Macchiavello-positivité ou négativité [3] ; nous croyons aussi qu'elles appellent les mêmes réponses :

a) Pour certaines rickettsies, la colorabilité au Giemsa dépend uniquement de constantes internes propres et reste relativement indépendante du milieu cellulaire de culture : c'est le cas de *R. orientalis*

(1) *R. prowazeki* et *R. mooseri* dans le poumon du lapin sont bleues et hypochromatiques au Giemsa ; *R. mooseri*, dans la vaginale du cobaye est rouge au Macchiavello, hyperchromatique au Giemsa.

(toujours hypochromatique) et de *R. burneti* et *R. conori* (toujours hyperchromatiques).

b) Pour d'autres rickettsies, au contraire (*R. prowazeki* et *R. mooseri*), et pour les gros virus, la colorabilité au Giemsa dépend non seulement de constantes internes propres, mais encore de *facteurs constitutifs du milieu cellulaire de culture*.

Il convient d'ailleurs de noter ici que la colorabilité est totalement indépendante de la vitesse de multiplication du germe et de l'importance de la culture : le virus de la psittacose est, en effet, hyperchromatique dans le sac vitellin, hypochromatique dans le sac allantoïque pour un même titre infectant, extrêmement élevé.

c) Bien plus, les colorabilités au Macchiavello et au Giemsa évoluent parfois indépendamment l'une de l'autre et peuvent être dissociées des variations morphologiques (taille par exemple). C'est là *une nouvelle preuve de l'extraordinaire dissociation des métabolismes parfois possible chez les rickettsies et chez les gros virus*.

b) Enfin, *malgré l'intensité des variations métaboliques aucune des propriétés biologiques fondamentales du germe (antigénicité, pouvoir infectant ou pathogène, etc.) ne paraît en être affectée*.

On est donc bien obligé de conclure à la signification biologique paradoxalement mineure de variations métaboliques que le procédé de coloration de Giemsa parvient si spectaculairement à démontrer.

SUMMARY

STAINING AFFINITIES OF *Rickettsiae* AND LARGE VIRUSES
(LYMPHOGRANULOMATOSIS-PSITTACOSIS GROUP).

III. — GIEMSA STAINING ; ITS ANATOMICAL AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE.

The experiments led to the paradoxical conclusion that the metabolic changes demonstrated by the Giemsa staining are not accompanied with very important modifications of fundamental biological properties of the microorganisms.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ROGER (F.) et ROGER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 128.
 - [2] ROGER (F.) et ROGER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 126.
-

TROIS NOUVEAUX SÉROTYPES D'ARIZONA (7 : 27-38; 21 : 1, 2, 5, 6; et 25 : 23-21)

par Mary A. FIFE, L. LE MINOR, P. R. EDWARDS
et L. CHAMBON.

(Communicable Disease Center, Public Health Service, U. S. Department
of Health, Education, and Welfare, Atlanta, Ga.,
et Institut Pasteur, Paris, et Institut Pasteur, Saigon)

Les trois sérotypes qui sont décrits ont été isolés des fèces de serpents apparemment normaux. Les types représentés par les formules antigéniques 7:27-38 et 25:23-21 ont été isolés de vipères de France capturées en Vendée et Maine-et-Loire et possèdent les caractères biochimiques typiques du groupe *Arizona*, excepté le dernier qui produit de l'indole. Tous deux font fermenter rapidement le lactose, liquéfient la gélatine, utilisent le malonate et sont D-tartrate, citrate et mucate négatifs (méthode de Kauffmann et Petersen, 1956). Au contraire, la culture représentée par la formule 21:1,2,5,6 isolée d'un *Ancistrodon* à Saigon est aberrante : elle fait fermenter lentement le xylose, n'acidifie pas les milieux lactosés, produit de l'indole et cultive sur milieu KCN. Edwards et Fife [4] avaient antérieurement remarqué que les *Arizona* du groupe O:21 pouvaient cultiver sur milieu au KCN.

Le type 7:27-38 (CDC 1995-57) est agglutiné faiblement par le sérum standard anti-O du groupe 7, mais est agglutiné au titre du sérum préparé au moyen du sérotype 7:27-31 (culture 3596-55 décrite par Edwards, Geurden et Fain [3]). Les résultats des épreuves d'agglutination et d'absorption sont donnés dans le tableau I. Ceci montre que le groupe O:7 est divisible en deux sous-groupes désignés respectivement : 7a, 7b et 7a, 7c. Les antigènes O de 3596-55 et 1995-57 sont identiques et désignés 7a, 7c.

La culture initiale de 1995-57 ne fut agglutinée par aucun des sérums correspondant aux antigènes H *Arizona* connus. Un sérum anti-H préparé à partir de cette culture agglutine la souche homologue à 1/40 000 et un *Arizona* possédant l'antigène H 27 à 1/1 000. Aucun des autres antigènes H d'*Arizona* ne réagissait avec le sérum. Le sérum H de 1995-57 fut alors absorbé avec la phase 1 de 3596-55 (7:27-31) pour saturer les agglutinines O ainsi que les agglutinines réagissant avec l'antigène H 27. Le sérum absorbé, stérilisé par addition de chloroforme, fut ajouté en proportion convenable à un milieu semi-solide. Le milieu,ensemencé avec une culture 1995-57, fut rapidement envahi. Cette dernière culture était agglutinée au titre homologue par le sérum H 27 et dans les épreuves d'absorption en saturait toutes les agglutinines H. La culture initiale possédait un antigène H

non décrit (H 38) en phase 2. La phase 1, mise en évidence par la méthode de Gard, est l'antigène H 27 typique. La formule antigénique de 1995-57 est donc 7a, 7c : 27-38.

Le type 21 : 1,2,5,6 (CDC 4346-57) est agglutiné au titre du sérum *Arizona* O 21 et en sature toutes les agglutinines. Les antigènes H sont monophasiques et agglutinés au titre des sérums préparés au

TABLEAU I. — Relations antigéniques dans le groupe *Arizona* O : 7.

Antigènes	S é r u m s					
	CDAI 184 (7a,7b)			3596-55 (7a,7c)		
	Non absorbé	Absorbé par 3596-55 (7a,7c)	Absorbé par 1995-57	Non absorbé	Absorbé par CDAI 184 (7a,7b)	Absorbé par 1995-57
CDAI 184 (7a,7b)	2000	500	500	200	< 25	< 25
3596-55 (7a,7c)	200	< 25	< 25	2000	1000	< 25
1995-57	200	< 25	< 25	2000	1000	< 25

moyen des souches qui possèdent les antigènes H : 1,2,5 ; 1,2,6 ; et 1,2,5,6 et à un degré moindre dans les sérums pour les antigènes H : 1,2,10 ; 1,3,11 ; et 1,7,8. Quand on recherche l'agglutination dans les sérums saturés correspondant à un facteur isolé, l'agglutination apparaît dans les sérums H : 2,5, et 6. La culture 4346-57 possède donc les antigènes H : 1,2,5,6. Trois autres sérotypes ayant des antigènes H analogues ont été décrits [2, 4, 5]. Les antigènes H de ces trois types diffèrent légèrement les uns des autres. Mais puisque les sérums H n'ont pas été préparés pour chacune des cultures, on ne peut affirmer que les antigènes H de 4346-57 soient identiques aux antigènes H des trois autres sérotypes. Cependant, dans les épreuves d'absorption les antigènes H de 4346-57 se comportent de façon identique à ceux de 151-57 (22 : 1,2,5,6) d'Edwards, Fife et Le Minor [2]. Il est probable que les antigènes H de ces deux souches sont très étroitement liés ou identiques. On peut conclure, des résultats cités ci-dessus, que la culture 4346-57 a la formule 21 : 1,2,5,6.

Le type 25 : 23-21 (CDC 4305-57) est agglutiné au titre du sérum *Arizona* O 25 dont il sature totalement les agglutinines. Les antigènes H sont diphasiques : la phase 1 est agglutinée au titre du sérum *Arizona* H 23 et en sature totalement les agglutinines. La phase 2 est identique à l'antigène *Arizona* H 21 comme le démontrent les épreuves d'agglutination et d'absorption. La formule de cette souche est 25 : 23-21.

RÉSUMÉ. — Description de trois nouveaux sérotypes d'*Arizona* isolés des fèces de serpents normaux. Les formules antigéniques des sérotypes sont 7 : 27-38 ; 21 : 1,2,5,6 ; et 25 : 23-21. Le premier type mentionné possède un antigène H jusqu'ici inconnu.

SUMMARY

THREE NEW SEROTYPES OF *Arizona*.

Description of three new serotypes of *Arizona* isolated from stools of normal snakes. The antigenic formulae are : 7 : 27-38 ; 21 : 1,2,5,6 ; 25 : 23-21. The first of these three types possesses a sofar unknown H antigen.

★
★ ★

Nous remercions M^{lle} Charrié-Marsaines de l'aide technique qu'elle nous a apportée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EDWARDS (P. R.). et FIFE (M. A.). *Applied Microbiol.*, 1956, **4**, 46.
- [2] EDWARDS (P. R.), FIFE (M. A.) et LE MINOIR (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, (à paraître).
- [3] EDWARDS (P. R.), GEURDEN (L.) et FAIN (A.). *Ann. Soc. Belge Méd. trop.*, 1956, **36**, 393.
- [4] EDWARDS (P. R.) et ROHDE (R.). *Zbl. Bakt., I, Orig.*, 1957, **169**, 41.
- [5] FEY (H.), EDWARDS (P. R.) et STUNZI (H.). *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1957, **20**, 27.
- [6] KAUFFMANN (F.) et PETERSEN (A.). *Acta path. microbiol. Scand.*, 1956, **38**, 481.

CULTURE DES BACILLES TUBERCULEUX SUR PAPIER FILTRE

NOTE PRÉLIMINAIRE

par J. AUDRIN

(présenté par Jean LEVADITI).

(Laboratoire du Sanatorium Praz-Coutant [Haute-Savoie],
et Laboratoire du Sanatorium Rhône-Azur, Briançon [Hautes-Alpes])

Nous avons pensé que des bacilles tuberculeux ensemencés sur un morceau de papier filtre posé à la surface d'un milieu de culture devaient pouvoir se nourrir, donc se développer, en utilisant les principes nutritifs du milieu qui imprègnent le papier par capillarité.

Nous avons utilisé du papier filtre sans cendres Durieux. Nous en avons coupé des bandes mesurant 50 mm de long sur 13 mm de large

que nous avons stérilisées à l'autoclave à 120° pendant une demi-heure, dans un tube hermétiquement bouché afin que l'humidité n'y pénètre pas. (Nous avons préféré ne pas effectuer de stérilisation au four Pas-



FIG. 1.

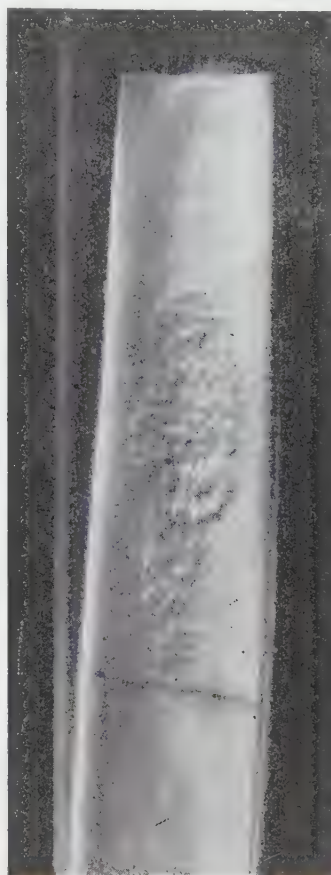


FIG. 2.

FIG. 1. — Le tube a été placé verticalement pour les besoins de la photographie.

teur, pour éviter un possible changement dans l'état chimique du papier, dû à une trop forte chaleur.)

1° BANDE DE PAPIER FILTRE PLACÉE A LA SURFACE D'UN MILIEU LIQUIDE. — Dans un tube de 17 x 17, stérile, nous avons mis 2 cm³ de milieu de Dubos au Tween 80, et nous y avons porté stérilement une bande de papier (la quantité de liquide est telle que le papier n'est pas submergé quand le tube est incliné).

Trois tubes ont été préparés de cette manière.

Nous avons alorsensemencé à la surface du papier dans chacun des trois tubes une goutte de culture de la souche H37Rv en Dubos au Tween 80, culture âgée de 10 jours. Nous avons, en même temps,ensemencé également un tube de Jensen. Au bout de dix jours d'étuve à 37° une douzaine de colonies blanc jaunâtre étaient apparues sur le papier (fig. 1). La végétation était moins importante que sur le tube de Jensen, témoin.

2° PAPIER FILTRE PLACÉ A LA SURFACE D'UN MILIEU SOLIDE. — Nous avons tenté la même expérience en plaçant les bandes de papier à la surface de milieux de Jensen (fabriqués au laboratoire). Sept bandes de papier sur Jensen ont étéensemencées avec une culture H37Rv en Dubos ainsi que 7 tubes de Jensen témoins.

Au bout de dix jours, des colonies présentant le même aspect et la même couleur ont poussé sur les deux séries de tubes (fig. 2). La végétation semble être égale sur tous les tubes.

Dans le même temps 5 souches de bacilles tuberculeux isolées à partir de lavages gastriques effectués chez des malades ont été broyées et mises en suspension dans de l'eau distillée à la dose d'environ 1 mg de bacilles par centimètre cube.

Une goutte de chacune de ces suspensions étaitensemencée sur un tube de Jensen avec papier, une autre goutte sur un tube de Jensen témoin. La lecture au dixième jour montrait une végétation abondante sur le papier et sur le Jensen témoin pour 4 de ces souches.

La végétation sur le papier et sur le Jensen témoinensemencés avec la cinquième souche était faible et a dû être mise en évidence par la révélation au tellurite de potassium.

Nous avons alors décidé de continuer nos essais avec les papiers sur milieu de Jensen, les résultats nous paraissant supérieurs à ceux obtenus avec le papier sur milieu liquide et les manipulations, d'autre part, étant plus simples.

COLORATION DES MICRO-COLONIES AYANT POUSSÉ SUR LES BANDES DE PAPIER.

— Nous avons pensé qu'il serait intéressant de mettre en évidence les micro-colonies après quelques jours d'étuve en colorant les bandes de papier par le Ziehl comme s'il s'agissait de cultures sur lames [1].

Nous avons d'abord déposé une goutte d'une suspension de bacilles sur une bande de papier filtre. Après séchage pendant quelques heures à environ 30°, nous avons trempé la bande dans de l'alcool méthylique pour fixer ; puis nous l'avons laissée douze heures dans du Ziehl à froid. La bande a été ensuite décolorée pendant cinq minutes dans l'acide sulfurique au 1/4, puis pendant dix minutes dans de l'alcool à 95° et enfin recolorée par une immersion rapide dans du bleu de méthylène. La bande de papier ainsi colorée a ensuite été séchée, puis rendue transparente avec de l'huile de paraffine et posée sur une lame de verre. L'observation au microscope à un grossissement de 100 diamètres montre de belles chaînes de bacilles, rouges, au milieu de la trame du papier légèrement bleuâtre (fig. 3).

Nous avons ensuite pris deux crachats positifs. Après traitement au

teepol sodé en vue de la culture [2], nous avons pour chacun d'eux, d'une part, fait un frottis avec une goutte du culot de centrifugation sur une lame, d'autre part, ensemencé également ce culot sur plusieurs tubes contenant une bande de papier sur milieu de Jensen, ainsi que sur un tube de Jensen témoin.

La lame colorée au Ziehl montrait pour le premier produit une vingtaine de bacilles par champ et pour le second entre 30 et 40 bacilles par champ. Les tubes ont été mis à l'étuve à 37°.

Pour chaque produit une bande était enlevée du tube de milieu où



FIG. 3.

elle était placée, séchée, fixée et colorée comme ci-dessus, après quatre jours, six jours et huit jours d'étuve.

Les résultats sont schématisés dans le tableau suivant :

	EXPECTORATION N° 1.	EXPECTORATION N° 2.
4 jours	Quelques chaînes très courtes de 4 à 5 bacilles.	Nombreuses chaînes de 4 à 5 bacilles.
6 jours	Les chaînes sont déjà visibles à 100 D, assez peu nombreuses.	Nombreuses chaînes bien visibles à 100 D.
8 jours	Plusieurs longues chaînes dans chaque champ.	Très nombreuses et très longues chaînes.

Nous avons gardé à l'étuve le tube témoin et un tube avec papier pour chacun des deux produits.

Des colonies visibles n'y sont apparues, sur le témoin et sur le papier, qu'après le seizième jour.

On voit donc qu'une bande de papier filtre se comporte grâce à l'adsorption des principes nutritifs du milieu, comme la surface même du milieu de culture sur lequel elle est posée. (Si la bande est placée à la surface d'un milieu liquide, elle se comporte comme la surface d'un milieu solide.)

Cela permet, non seulement le repiquage de souches de bacilles, mais aussi la culture de bacilles à partir de produits pathologiques. De plus, il est possible, dans ce dernier cas, en retirant les bandes de papier du milieu sur lequel elles se trouvent et en les colorant au Ziehl, de mettre en évidence, par l'observation microscopique, des micro-colonies bien avant l'apparition de colonies visibles à l'œil nu.

Notre intention est de continuer cette expérimentation avec un assez grand nombre de cas, puis d'utiliser cette méthode pour l'étude de la résistance des mycobactéries, en employant des bandes de papier préalablement imprégnées de substances médicamenteuses.

SUMMARY

CULTURE OF TUBERCLE BACILLI ON FILTER PAPER.

A strip of filter paper behaves like the surface of the culture medium on which it lies.

This allows the subcultures and the culture of bacilli from pathological material. In this last case, it is also possible by taking away the strips, staining them with Ziehl and examining them for the presence of bacilli, to demonstrate the presence of micro-colonies a long time before the appearance of colonies visible with the naked eye.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PRYCE (D. M.). *J. Path. Bact.*, 1941, **53**, 327.
 - [2] TISON (F.) et AUDRIN (J.). *Rev. Tub.*, 1955, **49**, 197.
-

TITRAGE DU SÉRUM ANTICHARBONNEUX SUR LE HAMSTER DORÉ

par N. STAMATIN et P. CRISTESCU.

(Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest)

Le titrage du sérum anticharbonneux est un problème qui n'est pas définitivement résolu. On utilise d'habitude le lapin (Marchoux, 1895 ; Sobernheim, 1931) ou le cobaye (Stamatin et Schäfer, 1944). Popovici et Wegener (1950), Isopescu et ses collaborateurs (1950) obtiennent certains résultats sur la souris, en utilisant pour le contrôle de l'immunité des souches œdématogènes-acapsulogènes. Nous avons pratiqué et nous avons préféré jusqu'à présent le titrage sur le cobaye qui, fait dans certaines conditions, donne des résultats acceptables. Mais de tels résultats sont conditionnés par de nombreux facteurs : saison, souche de contrôle, état général des animaux, qui ne peuvent être toujours réalisés, ce qui fait que la méthode est assez capricieuse.

Ces faits nous ont décidés à essayer de déterminer la valeur du sérum anticharbonneux sur le hamster.

MATÉRIEL.

Sérums. — Les sérums anticharbonneux étaient préparés soit sur des chevaux, soit sur des moutons, en utilisant des souches acapsulogènes-œdématogènes.

Hamsters. — On a utilisé, en général, des animaux jeunes, dont le poids variait entre 70 et 100 g.

Cobayes. — On a utilisé des animaux dont le poids variait entre 400 et 600 g.

Souris. — Jeunes de 18 à 20 g.

Souches de contrôle. — Le contrôle de l'immunité conférée au hamster ou au cobaye, par les différents sérums immuns a été fait avec la souche vaccinale Tzenkovski, qui a une virulence correspondant au deuxième vaccin pasteurien. Dans toutes nos recherches ces animaux ont été inoculés avec des suspensions de spores en eau physiologique glycinée à 50 p. 100. Les animaux inoculés recevaient ainsi, en même temps que les spores, une certaine quantité de glycérine qui, comme on le sait, favorise l'infection. Les souris sérumisées étaient inoculées par voie pleurale avec une souche œdématogène-acapsulogène à la dose de 0,3 ml d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures.

MÉTHODE DE TRAVAIL.

Les hamsters étaient injectés d'abord avec le sérum, à dose variable et par voie sous-cutanée, et, vingt-quatre heures plus tard, ils recevaient, toujours par voie sous-cutanée, la suspension de spores en eau physiologique glycinée à 50 p. 100. Simultanément, on inoculait, à la même dose, quelques animaux témoins, au moins quatre par expérience.

Le titrage de chaque sérum a été fait aussi sur cobaye en utilisant la même technique. Trois sérums qui n'étaient pas phénolés ont été examinés aussi sur souris, d'après la méthode de Popovici et Wegener (1950). Les souris étaient inoculées par voie péritonéale avec du sérum et, vingt-quatre heures plus tard, elles recevaient, par voie intrapleurale, une dose de culture sûrement mortelle d'une souche œdémato-gène-acapsulogène.

RÉSULTATS.

Les résultats obtenus au cours de nos recherches sont résumés dans le tableau ci-joint. Il en découle que, par comparaison avec le cobaye ou la souris, le hamster est un animal qui se prête très bien à la

TABLEAU I. — Titrage des sérums anticharbonneux.

Sérums	Sur le hamster						Sur le cobaye						Sur la souris			
	Dose de sérum en ml						Dose de sérum en ml						Dose de sérum en ml			
	L						L						L			
	0,25	0,50	1	2	m.	m.	0,50	1	2	4	6	m.	0,1	0,2	0,3	0,4
66 P.	+	R	R	R	R	R	50	+	+	+	+	+	R	-	-	5
67 P.	+	R	R	R	R	R	50	R	R	+	R	+	-	-	-	5
68 P.	R	R	R	R	R	R	50	+	+	+	+	+	R	R	-	5
Sab. C.	R	R	R	R	R	R	50	R	+	R	+	+	+	+	+	5
Soare C.	+	+	+	R	+	R	50	+	+	+	+	+	+	+	+	5
Smur. C.	+	+	+	+	R	R	50	+	+	+	R	+	R	-	-	-
144 R.	-	-	+	+	R	R	50	+	+	R	+	R	-	-	-	53
144 R.	-	-	+	+	R	R	50	+	+	+	R	R	R	R	R	4
151 R.	-	-	+	R	R	-	50	-	-	-	+	R	R	R	-	5
33 R.	-	-	+	+	R	R	50	+	R	+	+	R	R	R	-	5
Sclavo R.	-	-	+	+	+	R	50	-	-	+	R	R	+	+	R	4

— On n'a pas inoculé cette dose du sérum ; + L'animal est mort ; R L'animal résiste.

déterminaison de la valeur anti-infectieuse d'un sérum anticharbonneux. En effet, il donne des résultats constants et on n'observe chez lui que très rarement des résultats paradoxaux, ce qui arrive très souvent chez le cobaye et chez la souris ; chez ces animaux, comme le montre bien le tableau, on constate assez souvent la mort des sujets qui ont reçu une dose forte de sérum, tandis que ceux qui avaient été inoculés avec des doses plus réduites, résistent. De même, il arrive quelquefois que le cobaye témoin résiste et que les sérumisés meurent.

Nous n'avons pas fait de recherches concernant les relations qui peuvent exister entre la valeur anti-infectieuse pour le hamster et pour l'homme ou l'animal domestique, mais nos études antérieures nous ont montré que les sérums, ayant une bonne action chez le

cobaye, protègent aussi le cheval (Stamatin et coll., 1953). Spears (1955) qui a utilisé le lapin pour le titrage du même sérum arrive à une conclusion différente, à savoir : qu'il n'y a pas de relation entre la valeur protectrice d'un sérum pour le lapin et les animaux domestiques. Nous pensons que, d'une manière générale, un sérum qui protège contre l'infection charbonneuse un animal hautement sensible comme le hamster, doit avoir une action semblable pour les animaux domestiques, beaucoup plus résistants. Le titrage de ce sérum sur les animaux de laboratoire est utile et doit être pratiqué pour que des sérums sans valeur ne soient pas mis en circulation.

CONCLUSIONS.

1° Le hamster est un animal hautement sensible à l'infection charbonneuse. Il est mille fois plus sensible que le cobaye vis-à-vis de la souche Tzenkovski II. En effet la d. l. m. de la même suspension de spores fut, dans l'une de nos expériences, de 1/50 000 pour le cobaye et de 1/50 000 000 pour le hamster.

2° Bien qu'étant d'une sensibilité remarquable, le hamster bénéficie d'une manière exceptionnelle des anticorps sériques. En effet, un immunosérum qui protège à peine le cobaye à la dose de 4 à 6 ml vis-à-vis d'une infection faite avec 4 à 5 d. l. m., immunise le hamster à la dose de 0,25 à 0,50 ml vis-à-vis d'une infection faite avec 50 d. l. m.

3° Dans de telles conditions, nous considérons le hamster comme l'animal de choix pour le titrage du sérum anticharbonneux.

SUMMARY

TITRATION OF ANTI-ANTHRAX SERUM IN HAMSTERS.

1° Hamsters are highly sensitive to anthrax ; they are a thousand times more sensitive than guinea-pigs to the Tzenkovski strain : in one of the experiments, the minimal lethal dilution of the same suspension of spores was 1/50 000 for guinea-pigs and 1/50 000 000 for hamsters.

2° In spite of this high sensitivity to infection, hamsters are also very sensitive to serum antibodies : doses of 4 to 6 ml of immunesera scarcely protect guinea-pigs against 4 to 5 minimal lethal doses, whereas hamsters are immunized by doses of 0,25 to 0,50 ml of immunserum against 50 m. l. d. of anthrax.

3° Hamsters seem therefore to be choice animals for titration of anti-anthrax sera.

BIBLIOGRAPHIE

- ISOPESCU (I.) et CORMUS (D.). *Anuarul Inst. Patol.*, 1950, **2**, 53.
MARCHOUX (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1895, **9**, 785.
POPOVICI (I.) et WEGENER (M.). *Anuarul Institut. Patol.*, 1950, **2**, 33.
SPRAY (N. H.). *Brit. vet. J.*, 1955, **111**, 535.
STAMATIN (N.) et SCHAEFER (W.). *Arhiva vet.*, 1944, **36**, 3.
STAMATIN (N.) et HARISIAD-TACU (A.). *Arch. roum. Path. exp.*, 1943, **13**, 207.
STAMATIN (N.), UNGUREANU (C.), IONICA (C.) et GOGOASA (V.). *Anuarul Inst. Patol.*, 1943, **3**, 155.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

A propos d'infections intestinales à *Alcaligenes faecalis* et de leur analogie avec les syndromes intestinaux à *Moraxella lwoffii*, par P. LE NOC et G. MOUSTARDIER.

Etude expérimentale du neuromyoxome, par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT.

Recherche de substances de groupes sanguins dans le sérum et la salive des bovins, par A. WROBLEWSKI, M^{me} L. PODLIACHOUK et P. MILLOT.

Résistance naturelle du lapin à l'infection expérimentale par *Plasmodium berghei*. Analyse des facteurs immunologiques, par M. G. FABIANI et M^{lle} J. ORFILA.

L'infection expérimentale du hamster par *Mycobacterium balnei*, par A. SAENZ fils.

Interactions entre la croissance des *Azotobacter* et celle du maïs, par J. POCHON et H. DE BARJAC.

Circonstances d'apparition et évolution de la réticulose plasmodiale qui caractérise certaines formes de corynebactériose expérimentale du lapin, par A.-R. PRÉVOT, J.-C. LEVADITI, M^{me} O. NAZIMOFF et M^{lle} H. THOUVENOT.

Etude des courbes d'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques, par J.-C. PATTE, H. HIRSCH et Y. CHABBERT.

ÉLECTIONS

MM. Bénazet, Bizzini, Mangalo, Relyveld, Roger ; M^{mes} Blass et Le Minor sont élus membres de la Société Française de Microbiologie.

LIVRES REÇUS

A.-R. Prévot. — *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*, 3^e édition. 1 vol. 362 p. Masson, édit., Paris, 1957. Prix : 2 500 fr.

Les deux premières éditions de ce Manuel ont été rapidement épuisées. Cette 3^e édition est entièrement revue et considérablement augmentée : 93 espèces nouvelles y ont été introduites ; les descriptions des espèces ont été complétées ; les clefs de détermination des groupes ont été améliorées. Afin de situer les anaérobies dans l'ensemble des Schizomycètes et de faire coïncider leur classification avec un système cohérent et naturel, l'ouvrage est précédé de l'exposé d'une classification générale des bactéries dont la doctrine de base est celle de Buchanan, modifiée d'abord par l'introduction des notions définies en 1929 par Pribram, puis par les études de systématique bactérienne réalisées par l'auteur avec divers collaborateurs (J. Magrou, J. Pochon et Y. Tchan, J. Brisou, etc., 1933-1957).

Un schéma figure la conception de l'auteur sur la juxtaposition des groupes bactériens et leurs affinités entre eux et avec les autres prokaryotes. Des tableaux synoptiques situent les anaérobies au sein des autres groupes bactériens.

Un index bibliographique permet de retrouver tous les travaux originaux sur lesquels s'appuie cette édition.

Ce manuel s'adresse à tous les laboratoires (médicaux, vétérinaires, industriels) qui ont à déterminer des bactéries anaérobies.

A.-R. P.

K. Lang. — *Biochemie der Ernährung*. 1 vol., XVI + 412 p., 9 fig., 24 schémas et 214 tableaux. Dietrich Steinkopff, édit., Darmstadt, 1957. Prix : DM 54,-.

On sait l'importance de plus en plus grande que prennent dans le monde les problèmes de l'alimentation. Ce livre fait partie d'une collection qui aura pour but d'en envisager tous les aspects scientifiques et qui comprendra des travaux ressortissant à des disciplines diverses : médecine humaine et vétérinaire, chimie et chimie physiologique, etc.

Le présent volume constitue un exposé général de l'état actuel de la question du point de vue biochimique. Il étudie le métabolisme des éléments les plus divers entrant dans l'alimentation de l'homme : glucides, graisses, cholestérine, protéines, oligo-éléments, substances minérales, et enfin toutes les vitamines dont l'étude représente plus de la moitié du volume. L'auteur espère que son ouvrage suscitera d'autres recherches dans ce domaine, devenu maintenant d'une importance capitale.

H. T.

JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY

Editors : B. C. J. G. KNIGHT and A. F. M. STANDFAST.

Contents of Vol. 17, No. 3, December 1957.

- MACLEOD, C. M. Obituary Notice—Oswald Theodore Avery (1877-1955).
- FURNESS, G. and ROWLEY, D. The presence of the transmissible agent F in non-recombining strains of *Escherichia coli*.
- METCALFE, G. and BROWN, M. E. Nitrogen fixation by new species of *Nocardia*.
- WINDER, F. G. and DENNENY, J. M. The metabolism of inorganic polyphosphate in mycobacteria.
- JONES, A. S., MARSH, G. E. and RIZVI, S. B. H. The isolation and composition of the nucleic acids of *Aerobacter aerogenes*.
- LINKS, J., ROMBOUTS, J. E. and KEULEN, P. The « bulging factor », a fungistatic antibiotic produced by a streptomyces strain, with evidence of an active water-excreting mechanism in fungi.
- EKLADIUS, L., KING, H. K. and SUTTON, C. R. Decarboxylation of neutral amino acids in *Proteus vulgaris*.
- SHAH, P. C., KING, H. K., HOLLIS, B. and FAIRHURST, A. S. Optical activity of amino acids formed by reductive amination in *Bacillus subtilis*.
- HACK, J. E. The effect of spore germination and development on plate counts of fungi in soil.
- FOTHERGILL, P. G. and YEOMAN, M. M. The mineral nutrition of *Rhizopus stolonifer*.
- BROWN, A. D. Some general properties of a psychrophilic pseudomonad: the effects of temperature on some of these properties and the utilization of glucose by this organism and *Pseudomonas aeruginosa*.
- GIOLITTI, G. and CRAVERI, R. A method for isolating streptomyces.
- SIMMONS, D. A. R. The hexose constituents of some shigella polysaccharide hydrolysates.
- McMILLAN, R. Morphogenesis and polymorphism of *Ankistrodesmus* spp.
- DI MENNA, M. E. The isolation of yeasts from soil.
- NICHOLAS, D. J. D. The effect of molybdenum deficiency on the catalase and peroxidase content of *Neurospora crassa*.
- NICHOLAS, D. J. D. and COMMISSIONG, K. Effects of molybdenum, copper and iron on some enzymes in *Neurospora crassa*.
- NEWTON, B. A. Nutritional requirements and biosynthetic capabilities of the parasitic flagellate *Strigomonas oncopelti*.
- NEWTON, B. A. The mode of action of phenanthridines: the effect of ethidium bromide on cell division and nucleic acid synthesis.
- SMITH, H. and TEMPEST, D. W. The uptake of amino acids during the terminal bacteraemia in guinea pigs infected with *Bacillus anthracis*.
- TEMPEST, D. W. and SMITH, H. The effect of metabolite analogues on growth of *Bacillus anthracis* in the guinea pig and on the formation of virulence-determining factors.
- LAUGHTON, N. and DAVIES, J. Animal strains of group G streptococci and their serological typing.
- HAWKER, L. E., HEPDEN, P. M. and PERKINS, S. M. The inhibitory effect of low temperature on early stages of zygospore production in *Rhizopus sexualis*.

The subscription rate is 90s. net per volume of 3 parts.

Single parts 35s. each, plus postage. Two volumes will be issued each year. Orders should be sent to your bookseller or to

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS
BENTLEY HOUSE, 200 EUSTON ROAD, LONDON, N.W. 1

Printed in France.

Le Gérant : G. MASSON.

Dépôt légal. — 1958. — 1er trimestre. — Numéro d'ordre 2882. — Masson et Cie, édit., Paris.
Ancien Imp. de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette, Paris.